

COMPLEMENTBINDINGSREACTIE

VOLGENS WITEBSKY, KLINGENSTEIN EN KUHN

BIJ TUBERCULOSE

W. H. BEEKHUIS



Digitized by the Internet Archive
in 2026

COMPLEMENTBINDINGSREACTIE
VOLGENS WITEBSKY, KLINGENSTEIN EN KUHN
BIJ TUBERCULOSE

COMPLEMENTBINDINGSREACTIE VOLGENS WITEBSKY, KLINGENSTEIN EN KUHN BIJ TUBERCULOSE

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKS-
UNIVERSITEIT TE GRONINGEN, OP GEZAG VAN
DEN RECTOR-MAGNIFICUS Dr. K. SNEYDERS
DE VOGEL, HOOGLEERAAR IN DE FACUL-
TEIT DER LETTEREN EN WIJSBEGEERTE,
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT
DER GENEESKUNDE TE VERDEDIGEN OP
DINSDAG 12 APRIL 1938 DES NAMIDDAGS TE
4 UUR PRECIES

DOOR

WILLEM HENRI BEEKHUIS

GEBOREN TE SYBRANDABUREN (GEM. RAUWERDERHEM)

VAN GORCUM & COMP. N.V.
ASSEN

Aan mijn Ouders
Aan mijn Vrouw



Het verschijnen van dit proefschrift is mij een welkome gelegenheid, U, Hooggeleerden, Oud-Hooggeleerden en Lectoren der Medische en Natuurphilosophische Faculteiten der Groningsche Rijksuniversiteit te danken voor het onderwijs, dat ik van U heb mogen ontvangen.

In de eerste plaats geldt deze dank U, Hooggeleerde POLAK DANIELS, hooggeachte promotor, voor alles, wat ik van U, zoowel in mijn studenten- als in mijn assistententijd heb mogen leeren.

Uw groote kennis en ervaring, Uw steeds aandringen op nauwkeurig weten en begrijpen, Uw wetenschappelijke zin hebben, samen met Uw humane opvattingen, steeds grooten indruk op mij gemaakt.

Na het verlaten van Uw kliniek heb ik steeds weer beseft, hoe alleen langdurige, ononderbroken concentratie op de medische wetenschap U heeft kunnen maken tot een niet hoog genoeg te schatten leermeester.

Zeergeleerde VAN DER ZOO DE JONG, U dank ik voor de hulp, die ik steeds en vooral ook bij het uitvoeren van mijn onderzoek, van U mocht ontvangen. Uw critische zin, Uw geestdrift voor werk, dat nieuwe gezichtspunten opent, zijn voor mij van veel belang geweest.

Dr B. H. Vos en Dr H. B. Vos dank ik voor de groote hulpvaardigheid mij betoond door het geregeld zenden van onderzoekmateriaal.

Dr GEERS zij eveneens mijn oprechte dank gebracht voor zijn belangrijke medewerking, evenals aan vele andere collegae, die mij met het zenden van bloedserum en exsudaat behulpzaam waren.

Verder betuig ik aan het laboratoriumpersoneel der interne afdeeling en aan allen, die mij op eenigerlei wijze behulpzaam zijn geweest bij het tot stand komen van dit proefschrift, mijn groote erkentelijkheid.

Tenslotte zij mijn mede-assistenten en allen, met wie ik heb samengewerkt, mijn hartelijke dank gebracht voor de sympathie en de vriendschap, die ik in mijn Groningschen tijd mocht ondervinden.

INHOUD.

	pag.
SEROLOGISCH ONDERZOEK IN HET ALGEMEEN	3
Serologisch onderzoek der tuberculose	3
Moeilijkheden van het serologisch onderzoek bij tuberculose, in vergelijking met dat bij andere ziekten	7
Moeilijkheden van het serologisch onderzoek door de afzonder- lijke plaats, die de tuberculose als infectieziekte inneemt	25
Moeilijkheden van meer algemeenen aard, die de serologische tuberculosereactie beïnvloeden	28
Specificiteit	35
Bespreking naar aanleiding der methoden der tuberculose- reacties	44
Resultaten met complementbindingsreacties bij de tuber- culose bereikt	54
EIGEN ONDERZOEK	62
Positieve reacties bij gezonden en bij patienten, die niet aan tuberculose in eenigerlei vorm lijden	70
Algemeene bespreking naar aanleiding der resultaten . . .	76
Duurzaamheid der antilichamen	77
Beschrijving van eenige belangrijke gevallen	77
Eindoordeel	80
EXSUDATEN	82
Transsudaat of exsudaat	91
Eigen onderzoek	97
Vergelijking met de resultaten van vorige onderzoekers . .	102
SAMENVATTING	106
ZUSAMMENFASSUNG	110

Motto: Other specialists devote themselves to the investigation of those small beings, the viruses and bacteria, whose presence in our tissues is responsible for infectious diseases; of the marvellous methods used by the organism in its fight against them.

(ALEXIS CARRELL,
Man, the unknown. 1936.)

INLEIDING.

Hoe eenvoudig de diagnose van een pleuritisch exsudaat meestal ook is, bij het bepalen van den aard van het aanwezige vocht rijzen herhaaldelijk moeilijkheden. Na bepaling van het eiwitgehalte, na onderzoek van de cellen en eventueel aanwezige bacterieën blijft er vaak nog onzekerheid bestaan, door welke oorzaak zich vocht in pleura- of peritoneaalholte heeft gevormd. Opmerkelijk is in dit verband, dat bij verschillende patienten in de kliniek een pleuritisch exsudaat werd gepuncteerd, bij wie de diagnose langen tijd niet gesteld kon worden, terwijl tenslotte een longtumor de oorzaak bleek te zijn. Aan den anderen kant komen herhaaldelijk gevallen voor, waarbij men den tuberculeuzen aard van een exsudaat in borst- of buikholte aan moet nemen op grond van het onderzoek van het eiwitgehalte en celsoorten, doch waarbij op geen enkele wijze tuberkelbacillen kunnen worden aangetoond, nòch direct, nòch door de caviaproef of door middel van kweekproeven op de gebruikelijke voedingsbodems voor tuberkelbacillen.

Om deze redenen leek mij de complementbindingsreactie op tuberculose volgens KLINGENSTEIN, KUHN en WITEBSKY, waarmee in 1933 HABS en WITEBSKY ¹⁾ zulke goede resultaten verkregen, een aanwinst bij de nadere identificeering van exsudaten van allerlei aard.

Vanaf September 1934 werd dan ook in alle exsudaten van borst- en buikholte deze complementbindingsreactie uitgevoerd, voor welk doel ik uit verschillende klinieken materiaal toegestuurd kreeg.

Bovendien werd door mij bij een groot aantal patienten de waarde van deze reactie nagegaan in het bloedserum, waarvoor ik o.a. talrijke bloedproeven kreeg toegestuurd door de welwillende bemiddeling van Dr. HERMAN Vos te Hellendoorn en van Dr. GEERS te Appelscha.

In bijna al deze sera werd tegelijkertijd de reactie op lues, volgens WASSERMANN uitgevoerd.

Ter contrôle werden uit den aard der zaak de reacties verricht bij talrijke andere ziektegevallen en bij gezonden.

Alvorens over te gaan tot een bespreking van de uitkomsten van

deze onderzoekingen, past een bespreking van het serologisch onderzoek, speciaal dat der tuberculose, en beschouwingen over verschillende andere methoden van serologisch onderzoek. Het spreekt vanzelf, dat hierbij nogal eens wordt verwezen naar de uitvoerige overzichten, die op dit gebied uitgekomen zijn. De literatuur over het te bespreken onderwerp is enorm uitgebreid. Zoo geeft PFANNENSTIEL ²⁾ in 1923 bij zijn studie over de tuberculosaserodiagnostiek reeds 33 bladzijden literatuur met ± 700 nummers en daarna is het aantal publicaties nog zeer sterk toegenomen.

SEROLOGISCH ONDERZOEK IN HET ALGEMEEN.

Het aantoonen van specifieke afweerstoffen tegen bacteriële ziekteverwekkers behoort reeds lang tot onze diagnostische methoden. De reactie van GRUBER-WIDAL ³⁾ voor de typhusdiagnose is de meest bekende. Hierbij worden typhusbacillen geagglutineerd door bloedserum van een patient, die gedurende meer dan een week aan typhus geleden heeft. De reactie is specifiek, want het serum van dezen patiënt kan alleen typhusbacillen of hoogstens bacillen van de typhusgroep tot samenklontering brengen. Bij deze reactie bindt de afweerstof (het antilichaam) zich aan den ziekteverwekker (antigeen).

Bij talrijke ziekten zijn deze en soortgelijke methoden aangewend voor de diagnostiek: lues, ziekte van BANG, ziekte van WEIL, vlektyphus, en ook voor de tuberculose. Het belang van deze methoden van onderzoek ligt voornamelijk in de specificiteit der reacties.

SEROLOGISCH ONDERZOEK DER TUBERCULOSE.

Reeds vrij spoedig na het ontdekken van den tuberkelbacil in 1882 ⁴⁾ heeft men in het bloed van tuberculoselijders gezocht naar specifieke antilichamen. In 1898 berichtten DUBARD ⁵⁾ en ARLOING ⁶⁾ vrijwel gelijktijdig, doch onafhankelijk van elkaar, dat het hun gelukt was, tuberkelbacillen te agglutineeren met specifieke antisera. Van tuberkelbacillen kan namelijk niet zonder meer een homogene emulsie gemaakt worden, daar de waskapsel dit belet. De groote vondst van deze beide onderzoekers was dan ook, dat ze er in slaagden een homogene cultuur te verkrijgen, waarin dus de bacillen niet samenklonterden. (Eigenlijk was dit reeds eerder gedaan door FERRAN ⁷⁾).

ARLOING nam eerst experimenten met geiten, die hij met tuberculine of met tuberkelbacillen subcutaan inspoot en waarvan het bloedserum de tuberkelbacillen dan tot sterke agglutinatatie bracht. Daarna heeft hij ditzelfde principe toegepast voor de diagnostiek der tuberculose bij de menschen. Hij vond, dat 94% der tuberculoselijders een positieve reactie gaven en 22% der gezonden.

Slechts korten tijd later deelde hij mede, dat de geitensera agglutinerende kracht kregen ten opzichte van tuberkelbacillen, niet alleen

door injectie van tuberculine of van de bacillen zelf, doch ook na injectie van eucalyptol, guaiacol en kreosoot.⁸⁾ De specificiteit der reactie was daarmee wel min of meer onwaarschijnlijk geworden.

DUBARD⁹⁾ schreef aan de reactie naderhand geen diagnostische betekenis toe, nadat hij meer ervaring bij gezonden en tuberculose-lidders had opgedaan.

COURMONT¹⁰⁾ een leerling van ARLOING, beschreef specifieke agglutinininen in tuberculeuze exsudaten en drong sterk op het diagnostische gebruik aan. Zelfs in 1920 is COURMONT¹¹⁾ nog steeds tevreden over deze agglutinatiereactie. Men zou er mee uit kunnen maken, of een tuberculose genezen is! Het zou dus een activiteitsreactie zijn.

Het is echter langzamerhand komen vast te staan, dat aan deze reacties geen waarde toegekend kon worden. Het is onmogelijk gebleken om de zuivere tuberkelbacillen als antigeen in vitro te gebruiken voor agglutinatiereacties.

WIDAL en LE SOURD¹²⁾ hebben deze homogene cultuur, verkregen volgens de aanwijzingen van ARLOING en COURMONT, het eerst gebruikt voor het aantoonen van specifieke „sensibilatrices” in het serum van tuberculosepatiënten.

CAMUS en PAGNIEZ¹³⁾ gebruikten terzelfdertijd tuberculine als antigeen voor de complementbindingsreactie.

KOCH¹⁴⁾ beval als antigeen voor agglutinatieproeven de fijn-gepoederde bacillenmassa aan, die voor het bereiden van Neutuberculin gebruikt werd, verdund tot 1/10.000 met physiologische zoutoplossing. KOCH zelf zegt echter reeds, dat hiermee geen belangrijke gegevens te verkrijgen zijn, daar er geen duidelijk verschil is te vinden tusschen individuen met en zonder tuberculose.

Hier moeten ook de onderzoeken worden genoemd, die in ons land werden ingesteld door RUITINGA¹⁵⁾. Deze paste wel als eerste de in 1901 door BORDET en GENGOU¹⁶⁾ beschreven complement-bindingsreactie toe, om specifieke antilichamen tegen tuberkelbacillen in het bloedserum aan te toonen. RUITINGA gebruikte deze methode bij een onderzoek naar de aanwezigheid van een specifieke „fixateur” in het bloedserum van met tuberkelbacillen geïnfecteerde konijnen en caviae. Als antigeen gebruikte hij een dichte suspensie van tuberkelbacillen in physiologische zoutoplossing. Inderdaad bleek op de 7e dag na de injectie haemolyseremming op te treden. Het bleek, dat na de 7e dag bij de reactie steeds meer complement gebonden kon worden. Door specifieke bindingsproeven bewees hij, dat zich werkelijk een antistof aan de tuberkelbacillen bond. Het agglutineerend vermogen van het serum der geïnfecteerde dieren steeg tot een titer van 1 : 3000.

De schr. merkte toen reeds op, dat merkwaardigerwijs het onverdunde serum niet werkzaam was („substance inhibitrice” van CALMETTE (1910), „inhibitin” van CAULFIELD (1911)).

Ook den invloed van tuberculine-injecties, die een toename der antilichamen veroorzaken, heeft RUITINGA reeds geconstateerd. Hij zag 6 weken na de laatste van een serie dagelijksche tuberculine-injecties bij een tevoren intraveneus met tuberkelbacillen ingespoten konijn, een sterke toename van den „fixateur”.

(Merkwaardig is, hoever deze daarmee zijn tijd voor was: pas in 1909 werd hier weer nader aandacht aan geschonken door BERTARELLI ²⁾ en in 1910 door RUPPEL en RICKMANN ¹⁷⁾ die een zeer krachtig antiserum verkregen door dieren eerst ziek te maken door intraveneuze injecties van tuberkelbacillen en, als zich tuberculeuze afwijkingen ontwikkeld hadden, tuberculine in te spuiten en ook bacillenextracten en levende bacillen.)

RUITINGA spreekt zijn twijfel uit, of deze fixateur bij tuberculoselijders wel aantoonbaar zal zijn, daar het bij konijnen gebleken was, dat de fixateur alleen ten opzichte van den homologen stam, waarmee geïnjecteerd was, aanwezig was.

In 1908 ¹⁸⁾ bespreekt hij nog eens zijn bezwaren tegen de toepassing der complementbindingsreactie bij de tuberculose, daar hem gebleken was, dat bij proeven op konijnen de fixateur zich alleen laat aantoonen met bacillen van denzelfden stam, soms met bacillen van een anderen stam, zonder dat men weet, waar dat van afhangt. In andere gevallen wordt in 't geheel geen fixateur gevonden. Ook heeft het antigeen (een suspensie van tuberkelbacillen) soms een sterke anticomplementaire werking.

Ook in 1903 beschreven BORDET en GENGOU ¹⁹⁾ hun onderzoekingen met de complementbindingsmethode bij caviae, die ingespoten waren met vogeltuberkelbacillen (humane tuberkelbacillen waren te virulent). Het caviaserum kreeg de eigenschap om èn met humane èn met aviaire tuberkelbacillen complement te binden.

In 1907 werkte BONOME ²⁰⁾ een praecipitatie-methode uit met een extract, met glycerine en water uit tuberkelbacillen verkregen, doch ook deze methode verschaftte geen uitkomsten van beteekenis.

BESREDKA ²¹⁾ berichtte in 1914 over zijn resultaten met een door hem bereid antigeen in een complementbindingsreactie, in 1921 wijzigde hij de bereidingsmethode van het antigeen. De bacillen werden daarbij gekweekt op een voedingsbodem van eidooier, waaraan hij in 1921 de wijziging toevoegde, dat hij een alkalisch milieu gebruikte. ²²⁾ De resultaten waren uitstekend, ook de na-onderzoekers zijn vol lof

over de met dit antigeen bereikte uitkomsten. Ik kom op deze onderzoeken naderhand nog terug.

In 1935 vervaardigde BESREDKA ²³⁾ een nog gevoeliger antigeen door bacillen op eidooier te kweken in alkalisch milieu gedurende 45 dagen en hiervan het autolysaat te gebruiken.

In 1921 kwam FORNET ²⁴⁾ nog eens met een agglutinatie-methode, waarvoor hij het antigeen op een toen nog nieuwe wijze bereid had. Hij ging uit van de veronderstelling, dat het wasachtige omhulsel der tuberkelbacillen de inwerking der humorale antilichamen bemoeilijkt. Zonder dezen wasmantel zouden de bacillen alle antigene en immunisatorische eigenschappen bezitten, die tot nu toe niet te vinden waren. Hij trachtte daarom met behulp van aetherdampen de bacillen van de waslaag te ontdoen. Hoewel het van FORNET op zichzelf juist was, dat hij de waslaag aanzag voor het omhulsel der specifieke bacteriële stoffen, was de bereiding van het antigeen een mislukking. BIGNAMI ⁹⁾ kon zelfs aantonen, dat het „tuberculosediagnosticum” van FORNET een oplossing was van mononatriumphosphaat met 0.6% phenol, die nog eenige zuurvaste bacillen bevatte, en dat men dezelfde verschijnselen kreeg met een 0.6% phenoloplossing met mononatrium fosphaat, zoodat van een specifiek diagnosticum niet gesproken kon worden. De poging van FORNET had dus geen effect. Wel was van groot belang zijn aanwijzing om de tuberkelbacillen op de een of andere wijze te behandelen, om ze in vitro werkzaam te maken. Want op dit gebied liggen de grootste moeilijkheden voor het specifieke serodiagnostische onderzoek der tuberculose. Terwijl b.v. de typhusbacillen zonder verdere bewerking als antigeen gebruikt kunnen worden, is dit voor de tuberkelbacillen niet het geval. Het heeft in den loop der jaren niet aan methoden ontbroken, om den tuberkelbacil van de omhullende waslaag te ontdoen.

Zooals reeds vermeld is, probeerde FORNET het gestelde doel te bereiken door de inwerking van aetherdampen gedurende 6 tot 8 uren. Reeds vroeger (BONOME in 1907 ²⁰⁾ e.a.) was getracht extracten te bereiden uit de intacte bacillen, doch later ging men er toe over, om eerst, evenals FORNET had geprobeerd, de waslaag te vernietigen. WASSERMANN ²⁵⁾ trachtte dit te bereiken, door de bacillen, die gegroeid waren op hersen-glycerine-agarbodem, met tetraline (tetra-hydro-naphthaline) de zuurvastheid te doen verliezen. Bij broedstoof-temperatuur werd 4 tot 12 weken lang 2 Gr. der cultuur met tetraline geschud, tot geen zuurvaste elementen meer waren aan te toonen. Daarna werd gecentrifugeerd, het sediment met aether gewasschen en daarna gedroogd. Het overblijvende poeder werd als antigeen

gebruikt. Bij uitvoering der complementbindingsreactie met dit antigeen werden vrij goede resultaten bereikt. Daar het echter weinig specifiek bleek, is het later weer verlaten.

BOQUET en NÉGRE ²⁶⁾ werkten in navolging van PÉTROFF met een methyalcoholextract, KLOPSTOCK en NEUBERG ²⁷⁾ verwijderden de waslaag met epichloorhydrine en extraheerden met aethylalcohol.

WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN ²⁸⁾ extraheeren eerst de in koude alcohol oplosbare stoffen, en verwijderen deze. Daarna maken ze een extract met pyridine, hetgeen na indamping en nog een extractie met aceton als antigeen fungeert.

Iedere onderzoeker is geneigd de door hem gevolgde bereidingswijze van het antigeen voor de beste te houden. De resultaten, die ze er zelf mee bereiken, zijn meestal goed, doch dit ligt vaak aan het feit, dat er te weinig contrôlegevallen worden onderzocht, zoodat te veel de nadruk valt op de gevoeligheid en minder op de specificiteit. Na onderzoekers komen dan vaak tot veel minder gunstige uitkomsten.

De met de verschillende antigenen behaalde resultaten loopen echter zeer uiteen. Dit is voornamelijk een gevolg van het groote verschil in bereidingswijze. Want, indien men de met de verschillende antigenen gevolgde methoden beschouwt, blijken deze niet zooveel uiteen te loopen, dat daardoor de verschillende uitkomsten verklaard worden. De algemeene moeilijkheden, die alle serumreacties op tuberculose bieden, zijn voor alle onderzoekers gelijk. De reden, waarom het eene antigeen goed, het andere minder goed werkt, moet meestal in het antigeen zelf liggen.

MOEILIKHEDEN VAN HET SEROLOGISCHE ONDERZOEK BIJ TUBERCULOSE, IN VERGELIJKING MET DAT BIJ ANDERE ZIEKTEN.

Zooals reeds gezegd, hebben vrijwel alle onderzoekers gemeend, op een eigen wijze een antigeen te moeten bereiden. Daar hier inderdaad een der belangrijkste bezwaren van het serologisch tuberculose-onderzoek in te vinden is, zal ik beginnen, over de bereidingswijzen het een en ander mede te deelen.

DE ANTIGEENBEREIDING.

Wanneer men de bereiding der antigenen wil bespreken, is het noodzakelijk, eerst de eigenschappen der tuberkelbacillen na te gaan.

Immers de bijzondere aard dezer bacillen maakt het zoo uiterst lastig, een werkzaam antigeen te bereiden.

EIGENSCHAPPEN DER TUBERKELBACILLEN.

De belangrijkste eigenschap, zoowel voor de pathologie als voor de antigeenbereiding, is de z.g.n. zuurvastheid, in 1882 door EHRLICH ontdekt. Hieronder wil ik een overzicht geven van de verschillende lichamen, welke aangetroffen werden bij het chemisch onderzoek der tuberkelbacillen en van de biochemie daarvan. Dit overzicht is door mij voor een groot deel samengesteld uit de gegevens van E. LONG ²⁹⁾, voor een ander deel uit de meer recente publicaties, welke door KALLOS en KALLOS-DEFFNER ³⁰⁾ vermeld worden en tenslotte uit de losse publicaties van den laatsten tijd, welke ik bij naspeuring in de literatuur aantrof.

Tuberkelbacillen bestaan, evenals alle bacterieën en cellen, uit lipoiden, proteïnen, koolhydraten en anorganische verbindingen. We zullen deze afzonderlijk bespreken.

Lipoiden: Deze zijn v.n.l. onderzocht door ANDERSON en CHARGAFF (J. Biol. Chem. 1927, 1929 en 1930) in een grootsch opgezet onderzoek. De tuberkelbacil bevat meer lipoiden dan andere bacterieën, de humane tuberkelbacil $\pm 23\%$. De gedroogde bacillen bestaan voor een derde tot een vierde gedeelte uit deze vetachtige stoffen; zoo mag men ze noemen, omdat ze zijn te extraheeren met aether, chloroform, benzol, toluol en xylol. De lipoiden zijn vooral complexen van phosphatiden. De helft van alle lipoiden is een wasachtige substantie, die onoplosbaar is in alcoholaether, aceton, methylalcohol, wèl oplosbaar in aether; verder vindt men een fractie, oplosbaar in aether, niet in aceton, en een gedeelte, dat in aether en in aceton oplosbaar is. Men kan de ruwe lipoiden dus onderscheiden in:

1. een fractie, oplosbaar in aether en niet in aceton, d.i. een phosphatide, dat o.a. een koolhydraat bevat, het maninositose (samengesteld uit inosit, mannose en een links-draaiende hexose).
2. een fractie, oplosbaar in aceton en in aether.
3. de genoemde wasachtige substantie.

Beide eerste fracties bestaan voor $\pm 2/3$ deel uit vetzuren: palmitine- en oliezuur, en uit tuberculostearinezuur en phthionzuur, beide door ANDERSON ³¹⁾ ontdekt. In 1934 gelukte het aan SPIELMANN ³²⁾ het tuberculostearinezuur te zuiveren en de formule vast te stellen: $C_{19}H_{38}O_2$; dit was het eerste in de natuur waargenomen hoogere vetzuur met een oneven aantal C-atomen. SPIELMANN en ANDERSON ³³⁾ stelden

de formule van het phthionzuur vast: $C_{26}H_{52}O_2$. Dit laatste kan, bij een proefdier geïnjecteerd, typisch tuberculeuze weefselveranderingen veroorzaken, vandaar de naam.

5—10% der 1e fractie is glycerine-phosphorzuur.

Fractie 2: LONG noemt deze stoffen geen echte vetten, KALLOS wél. CHARGAFF en ANDERSON spreken van vetachtige stoffen en verkregen na verzeeping polysacchariden en was, na hydrolyse der polysacchariden ontstaan d-arabinose, mannose, galactose en inosiet. In 1933 vond ANDERSON hierin nog een koolhydraat: trehalose.

De onder 3 genoemde wasachtige substantie is geen echte was, doch een nieuw soort phosphatidencomplex ³⁴⁾. Het is te scheiden in 2 fracties met verschillend smeltpunt. De eerste fractie smelt bij 200°—205°, door splitsing (koken met zure alcohol) ontstaan:

- 1e. een zuur, gelijkend op phthionzuur,
- 2e. een polysaccharide, dat bestaat uit d-arabinose, mannose en galactose ³⁵⁾,
- 3e. phosphor en wat glycerine.

De tweede fractie smelt bij lagere temperatuur, bevat glyceriden van een rij van vetzuren o.a. hexakosanzuren. Belangrijk is het feit, dat isomere hexakosanzuren in alle fracties der gezamenlijke lipoiden voorkomen en dat minstens in twee fracties polysacchariden aanwezig zijn ³¹⁾. Hierdoor nemen de tuberkelbacillipoiden een bijzondere plaats in onder de vetsubstanties der natuur.

STODOLA en ANDERSON ³⁶⁾ onderzochten in 1936 een stof, een hogere alcohol, optisch actief, karakteristiek bestanddeel van de was der humane tuberkelbacillen, die ze noemden: phthiocerol.

Aan welke der genoemde stoffen is nu de z.g.n. zuurvastheid der tuberkelbacillen toe te schrijven? Volgens ANDERSON ³⁷⁾ ³¹⁾ komt de zuurvastheid toe aan de z.g.n. „onverzeepbare was”. Dit gedeelte zou zeer gecompliceerd zijn en een zure en een alcoholfunctie hebben. Het is een zeer stabiele, sneeuw witte, amorphe stof, met eigenschappen van een hooger hydroxyzuur, en het is zuurvast.

Volgens KALLOS en KALLOS-DEFFNER is 56% van de was onverzeepbaar. Dit gedeelte is een zeer hoogmoleculair vetzuur: $C_{94}H_{188}O_4$, n-hexakosanzuur af kan splitsen bij 280° in hoog-vacuum. De onverzeepbare was is zuurvast.

De was bevat ook een aangenaam riekende stof en in 1933 hebben ANDERSON en NEUMANN een geel pigment geïsoleerd en dit phthiocol genoemd ³³⁾.

MACHEBOEUF, LÉVY en FETHKÉ ³⁹⁾ schrijven de zuurvastheid aan een groep van bijzondere stoffen toe met een zeer hoog s.g., die bij

verzeeping hoofdzakelijk vetzuren geven en slechts voor een gering deel onverzeepbaar zijn. Deze stoffen bevatten geen stikstof, geen phosphor en geen zwavel en de verzeepingsproducten bevatten geen in water oplosbare stoffen. De stof ziet er uit als een harde, witte was, die bij 57°—58° smelt en dan een doorschijnende, kleurlooze olie wordt.

Eiwitten: dit zijn allen nucleoproteïnen, vooral onderzocht door JOHNSON ⁴⁰⁾ en anderen. Als belangrijkste vondst is geïsoleerd het tuberculinezuur, dat de purinebasen: adenine en guanine bevat, verder de pyrimidinen: thymine en cytosine, een hexose, en 5-methylcytosine. Verder vond men geen karakteristieke, chemisch definieerbare eiwitstoffen. Typisch was het hoge gehalte aan hexonbasen. Bovendien zijn gevonden de aminozuren: tyrosine, tryptophaan, phenylalanine, glutaminezuur, valine, en proline.

Koolhydraten: Uit de tuberkelbacillen is door LAIDLAW en DUDLEY ⁴¹⁾ glycogeen geïsoleerd en ook een koolhydraatcomplex met den aard van een gom, een polysaccharide met bijzondere eigenschappen. ANDERSON e.a. vonden, dat het bestond uit: mannose, d-arabinose, d-glucose en inosiet, GOUGH toonde ook galactose en glykolzuur aan. Verder is nog een pentose aantoonbaar.

Anorganische stoffen: Hiervan bevatten de tuberkelbacillen 2—10%, meestal $\pm$ 6%. Daar deze stoffen voor het serologische onderzoek van geen beteekenis zijn, ga ik hier niet nader op in.

Naar aanleiding van deze bestanddeelen, kan het volgende gezegd worden over de biologische eigenschappen der tot nu toe gevonden fracties: alle, uit de tuberkelbacillen geïsoleerde hoofdfracties toonen een karakteristieke biologische werking. Zooals KALLOS en KALLOS-DEFFNER zeer terecht opmerken, moet men bij de beoordeeling, of men de fractie, die in staat is typisch tuberculoseweefsel te verwekken heeft gevonden, uiterst voorzichtig zijn. Men moet er namelijk rekening mee houden, dat de vorm der tuberculeuze aandoening niet alleen bepaald wordt door de locale inwerking van den tuberkelbacil doch ook door zijn immuunbiologische eigenschappen. Deze immuunbiologische verschijnselen bepalen juist het beloop der tuberculeuze infectie. Het onderzoek op dit gebied is nog lang niet voltooid, de bevindingen zijn echter uiterst belangwekkend.

I. Biologische eigenschappen der lipoiden.

A. Biologische eigenschappen der phosphatidefractie.

PINNER ⁹⁾ toonde aan, dat volkomen gezuiverde lipoiden uit

tuberkelbacillen zeer krachtige antigene eigenschappen bezitten; dit in tegenstelling met de beweringen van andere onderzoekers, die van meening waren, dat deze lipoiden alleen dan antigene eigenschappen konden ontplooiën, als ze met eiwit verbonden waren. PINNER bevrijdde de lipoiden van eiwit door vertering met trypsine en door dialyse. Het eindproduct gaf geen eiwitreacties en bevatte slechts een spoor eiwit. Toch was het een zeer krachtig antigeen. De verwijdering van het eiwit uit lipoidantigenen maakte de serologische werking tienmaal zoo sterk. Hiermee bevestigde hij de origineele onderzoekingen van K. MEYER ⁴²⁾, die reeds in 1912 bewees, dat de in alcohol oplosbare, doch in aceton onoplosbare fractie uit tuberkelbacillen bij konijnen antilichamen kon opwekken. Hij komt tot de volgende conclusie: „Bij de immunisatie met lipoidvrije bacillen en met de lipoiden der bacillen worden specifieke antilichamen gevormd, die slechts met het antigeen der voorbehandeling en met de volledige bacillen reageeren, echter niet met het heterologe antigeen. Daar de lipoidsera met de eiwitlichamen der bacillen niet reageeren, kan die antigene werking der lipoiden niet door bijmenging van sporen eiwit veroorzaakt zijn. De antigene werking der lipoiden is dus onomstootelijk bewezen.”

In 1928 bespreekt PINNER ⁴³⁾ de toen door ANDERSON ontdekte fosphatidefractie z.g. A³, die slechts 0.41% stikstof bevat, dus waarschijnlijk in het geheel geen proteïne, en die toch een goed antigeen is. Hij vond hierdoor zijn in 1927 geformuleerd standpunt bevestigd, dat voor de antigene functie der lipoiden geen eiwitbijmenging noodig is. De fosphatidefractie geeft complementbinding, niet alleen met het specifieke antiserum, doch ook met sera van tuberculosepatienten, terwijl tuberculoproteïnen dit niet doen. Onderzoekingen van PEDERSEN-BJERGAARD ⁴⁴⁾ in 1934 hebben nogmaals bewezen, dat PINNER gelijk had, dat het tuberculofosphatide antigene werking bezit.

Hoewel het dus vaststaat, dat de lipoiden uit tuberkelbacillen echte antigenen zijn en geen eiwit voor hun antigene werking noodig hebben, zijn SANDOR en NINNI ⁴⁵⁾ van meening, dat men toch moet spreken van „haptenen”. Zij zeggen, dat het „haptène lipoidique” der tuberkelbacillen alle bacillaire principes vergezelt en dat de complementbindende werking der proteïden, proteosen en polyholosiden *) soms alleen komt door de aanwezigheid van lipoiden stoffen. Het lipoidantigeen moet volgens hen een stof zijn, die zeer sterk

*) Holosiden = polysacchariden.

wordt geabsorbeerd en die de oplosbaarheidseigenschappen aanneemt van die stoffen, waarmee hij samengaat.

Het ligt m.i. meer voor de hand om aan te nemen, dat de proteïden, proteïosen en „polyholosiden” als haptene allen de medewerking van het lipoid noodig hebben, om als antigeen te kunnen werken.

De histopathologische werking van de phosphatidefracties is vooral bestudeerd door SABIN ⁴⁶⁾ ⁴⁷⁾ ⁴⁸⁾ en haar medewerkers:

intraperitoneale injectie bij konijnen en caviae van de phosphatidefractie prikkelt de monocytën tot vermeerdering, doet ze rijpen en geeft vorming van epithelioïedcellen en reuscellen (d.i. de werking van het rechtsdraaiende phthionzuur). Tenslotte treedt zelfs verkazing in alle tuberkels op. De gelijkenis met echt tuberculeus weefsel is dus volkomen, slechts ontbreken de tuberkelbacillen.

Merkwaardig is, dat SMITHBURN en SABIN ⁴⁹⁾ konden aantoonen, dat de overeenkomstige phosphatidefractie uit bovine en aviaire stammen, uit lepra- en thymothee-grasbacillen practisch dezelfde verschijnselen veroorzaakt.

ROULET ⁵⁰⁾ heeft kortgeleden nog eens bewezen, dat de tuberkelvorming inderdaad alleen veroorzaakt wordt door het tuberculo-phosphatide. Met andere z.g.n. phosphatiden b.v. lecithine, was het niet mogelijk dergelijke werkingen te krijgen. Eierlecithine (MERCK) b.v. verwekt een onbelangrijke weefselreactie.

Volgens een referaat in het Tuberculose referatenblad, verrichtten de Italianen OMODEI-ZORONI en DADDI ⁵¹⁾ intraveneuze injecties met de in aceton onoplosbare lipoiden en verkregen aldus pseudo-tuberkels zonder exsudatieve reactie of verkazing. Bij injectie van in aceton wel oplosbare lipoiden ontstond slechts een aspecifieke ontstekingsreactie.

B. Biologische werking der vetfractie.

De in aceton oplosbare vetfractie der tuberkelbacillen bevat groote hoeveelheden phthionzuur, zoodat het zeker zeer merkwaardig is, dat SMITHBURN en SABIN door injectie van deze fractie bij konijnen nooit tuberculeus weefsel konden verwekken.

PEDERSEN-BJERGAARD vond de vetfractie serologisch onwerkzaam.

C. Biologische eigenschappen der wasfractie.

SABIN, DOAN en FORKNER ⁴⁷⁾ vonden, dat de onverzeepbare substantie van de gezuiverde was, dus de stof, die de zuurvastheid der tuberkelbacillen bepaalt, bij intraperitoneale injectie bij konijnen een zeer sterke algemeene reactie van bindweefselcellen veroorzaakte.

PEDERSEN-BJERGAARD kon ook aan deze fractie de eigenschappen van een volledig antigeen toekennen.

De op blz. 9 genoemde aangenaam naar verwelkte bloemen riekende stof geeft bij inademing onaangename verschijnselen. KALLOS en KALLOS-DEFFNER geven hiervan uit eigen ervaring de volgende beschrijving: „3 tot 10 uur na de inademing van dezen geur trad eerst moeheid op, later misselijkheid, gewrichtspijnen en koorts. Eenige keeren kwamen plekken, waar een cutane tuberculinereactie was gedaan, weer op. Na 2 tot 3 dagen waren alle verschijnselen weer voorbij”.

II. Biologische eigenschappen der proteïnen.

De bacterieproteïnen toonen een sterke tuberculinewerking, veroorzaken bij tuberculeuze dieren specifieke ontstekingsverschijnselen en, in groote hoeveelheden gebruikt, shock of dood. (SABIN, MILLER, DOAN, en WISEMAN)⁵²⁾.

De in water oplosbare bacterieproteïnen veroorzaken temperatuursverhooging en locale bloedingen en wekken de mobiliseering van clasmatocten *) op⁵³⁾.

Het zijn echte antigenen, ze verwekken in normale dieren antilichamen en reageeren met homologe antisera (PINNER)⁴³⁾. Bij de reactie met serum van tuberculosepatienten waren ze echter veel minder werkzaam dan de lipoiden, of in het geheel niet werkzaam, als ze geheel zuiver vervaardigd waren.

HEIDELBERGER en MENZEL konden aantoonen, dat de huid van tuberculeuze caviae bij injectie van tuberculoproteïne het phenomeen van ARTHUS geeft. De eiwitstoffen der tuberkelbacillen hebben dus een sterke werking op de huid, doch zijn serologisch volkomen onbruikbaar.

III. Biologische eigenschappen der koolhydraten.

De *koolhydraten* zijn biologisch zeer belangrijk. De tuberculopolysacchariden zijn chemotactisch en toxisch voor neutrophiele leucocyten.

Het genoemde gomachtige polysaccharid (LAIDLAW en DUDLEY)⁴¹⁾ is een hoogst werkzaam hapteen t.o.v. serum van tuberculosepatienten

*) Zoo noemen de schr. die phagocyteerende cellen, die na de phagocytose der tuberkelbacillen, deze vernietigen.

of serum van paarden, die met doode tuberkelbacillen zijn geïmmuniiseerd. In de proeven van LAIDLAW en DUDLEY gaf het specifieke praecipitatie met immuun-serum tot in een verdunning van 1 : 6.400.000. Zelf kan het geen antilichamen opwekken, het is dus een typisch hapteen.

Interessant zijn in dit opzicht de proefnemingen van UHLENHUTH en REMY ³⁴⁾, die met een op een bijzondere wijze uit arabische gom verkregen koolhydraatpreparaat, dat practisch geen stikstof bevatte, zoo goed als geen antilichamen konden opwekken. Hoe meer zij de N₂ in het preparaat wisten te verminderen, hoe geringer werd de antigene functie. Soortgelijke proeven met een bijna stikstofvrij glycogeen leidden tot hetzelfde resultaat. Voor de antigene werking van een koolhydraat is dus zeer waarschijnlijk steeds eiwit noodig.

Ook blijken de polysacchariden uiterst belangwekkend, sedert HEIDELBERGER en AVÉRY ⁵⁵⁾ hebben aangetoond, dat de specificiteit der pneumococcentypen berust op de aanwezigheid van typen-specifieke polysacchariden in de kapsels der bacterieën.

Ik ben nogal uitvoerig op de bespreking der verschillende fracties en hun biologische beteekenis ingegaan, omdat de samenhang der verschillende onderdeelen van den tuberkelbacil met de immuunbiologische verschijnselen zoo belangrijk en ook zoo uiterst belangwekkend is.

Hoe gecompliceerd de tuberkelbacillen ook blijken te zijn, toch komen in de natuur bacterieën voor, die een zoo groote overeenkomst vertoonen met den tuberkelbacil, dat ze zelfs in staat zijn antilichamen op te wekken, die met tuberculose-antisera reageeren.

Zoo konden REITER en OGAWA ⁵⁶⁾ uit andere zuurvaste bacillen, saprophyten, een antigeen vervaardigen, dat reageerde met tuberkelbacillen-antiserum.

Doch ook pathogene bacterieën komen morphologisch en biologisch in aanmerking om verwarring te stichten. Het is reeds lang bekend, dat een diphtheriepatiënt een positieve tuberculoreactie *) in zijn serum kan vertoonen, zonder tuberculose te hebben, zooals uit de volgende aanhalingen blijkt:

URBAIN en FRIED ⁵⁷⁾ namen in 1921 experimenten: serum van tuberculosepatienten werd samengebracht met verschillende antigenen o.a. met een antigeen van diphtheriebacillen. In 3 van 20 gevallen trad complementbinding op. Daarna brachten zij het tuberkelbacillen-antigeen van BESREDKA **) samen met sera van verschillende ziekten.

*) Hieronder wordt verstaan de reactie van het serum met tuberkelbacillen-antigeen.

**) Zie blz. 17.

Alleen met antidiphtherieserum kon een binding verkregen worden. Tenslotte werden sera onderzocht van patienten met typhus (4), erisypelas (16), osteomyelitis (2), die allen met het antigeen van BESREDKA niet reageerden, doch van 21 diphtheriepatienten gaven 5 een positieve reactie. Deze positieve reacties willen de schr. toeschrijven aan de injectie van antidiphtherieserum. Dit lijkt mij, evenals WITEBSKY en KLINGENSTEIN ⁵⁸⁾ zeer onwaarschijnlijk uit quantitative overwegingen. BOQUET en NÈGRE ⁵⁹⁾ vermoeden, dat diphtheriebacillen daarom vaak een positieve reactie geven als antigeen, omdat ze veel phosphatiden bevatten.

WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN ⁶⁰⁾ vonden bij latere onderzoekingen nogmaals bevestigd, dat bij diphtherie onkarakteristieke reacties voorkomen, ook reeds geconstateerd in 1930 door WITEBSKY en KRAH ⁶¹⁾: de met diphtheriebacillenextract reagerende antilichamen van het antitoxisch diphtherieserum worden door voorbehandeling met tuberkelbacillen verwijderd. Het zou dus gaan om lipoidantilichamen, die tegen de substanties der bacillichamen gericht zijn.

KLOPSTOCK ⁶²⁾ deed absorptieproeven bij sterk positief-reagerende sera van tuberculosepatienten, die hij behandelde met een tuberkelbacillen-antigeen, waardoor alle antilichamen gebonden werden. Bewerkte hij dezelfde sera op soortgelijke wijze met antigenen van andere bacillen, dan trad *geen* verandering der reactie op, met uitzondering van een antigeen van diphtheriebacillen. Hiermee behandeld, verloren de sera duidelijk voor een gedeelte hun werking.

Verder is de tuberkelbacil in dit opzicht zeer verwant aan de *leprabacil*, zoodat serum van leprapatienten een positieve reactie kan geven met tuberculoseantigeen. Dit feit is zelfs door velen gebruikt om op deze wijze lepra te diagnosticeeren (natuurlijk moet een tuberculeuze infectie dan eerst worden uitgesloten). BRITO FONTES ⁶³⁾ vond bij 19 lepra-patienten de reactie van BESREDKA in 16 gevallen positief.

Zoo heeft BRANTS ⁶⁴⁾ nog in 1932 lepra met verschillende antigenen onderzocht en gevonden, dat het antigeen van WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN *) de meeste positieve resultaten gaf. 50 gevallen van lepra tuberosa en 4 van lepra mixta reageerden allen positief, op 26 gevallen van lepra nervosa: 20 positief.

WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN ⁶⁰⁾ kregen uit het Leprosorium te Riga een reeks bloedproeven toegestuurd, die meerendeels sterk positief reageerden.

*) Zie blz. 24.

Dat de syphilis bij de uitvoering der reactie op tuberculose zeer hinderlijk is, werd reeds besproken; op de mogelijkheden, deze moeilijkheden te ontgaan, kom ik nog terug.

Samenstelling der antigenen.

Bij verschillende infectieziekten bijv. bij Febris typhoidea bestaat het antigeen uit de typhusbacillen zelf (levend of gedood), in hun geheel. Bij de tuberculose is dit niet zoo eenvoudig, aangezien een suspensie van onveranderde tuberkelbacillen in vitro niet gebruikt kan worden voor het aantoonen van antilichamen, aangezien de waslaag der bacterieën belet, deze in emulsie te brengen. Zooals reeds besproken is, lag het succes der eerste pogingen van ARLOING en DUBARD en van de andere onderzoekers, die met een op deze wijze bereid antigeen werkten, hierin, dat ze door hun bijzondere kweekmethode een cultuur verkregen, die met zoutoplossing gemakkelijk in een homogene suspensie gebracht kon worden. Het is echter gebleken, dat het toch niet mogelijk is, deze onveranderde bacillen (dood of levend) met succes te gebruiken. (Zie ook CALMETTE ⁶⁵). Het is daarom noodzakelijk, de bacillen op de een of andere wijze voor te bereiden.

Zooals reeds eerder vermeld, was KOCH de eerste, die dit deed en de bacillen in fijn gepoederde toestand gebruikte.

BONOME ⁶⁶) bewerkte de bacillen op andere wijze en maakte een extract met glycerine.

CALMETTE en MASSOL ⁹) beproefden Alttuberculin als antigeen. Doch aangezien dit een mengsel is van specifieke en niet-specifieke stoffen, (het is immers een filtraat van een 6—8 weken oude glycerinebouilloncultuur van tuberkelbacillen, dat door verhitting tot 100° tot 1/10 deel van het oorspronkelijke volume is ingedampt) konden de resultaten niet bevredigend zijn. Later gebruikten CALMETTE en MASSOL ⁶⁷) antigenen, vervaardigd door maceratie der bacillen in peptonwater. Maceratie der tuberkelbacillen in water alleen, waardoor ze het z.g.n. B₁ verkregen, gaf een onvoldoende resultaat. Doch als ze de maceratie toepasten in een 10% Wittepeptonoplossing, (48 uur bij 65°) kregen ze een uitstekend antigeen (B₂), waarmee ze ook kleine hoeveelheden antilichamen aan konden toonen, en ook wordt de reactie hiermee niet beïnvloed door de „substance inhibitrice“*). De pepton zelf is volkomen onwerkzaam; door de pepton wordt dus een antigeen aan de bacillen onttrokken, dat alleen in water onoplosbaar is.

*) Zie blz. 32.

LARSON ⁹⁾ verkreeg zijn antigeen door tuberkelbacillen herhaaldelijk door middel van koolzuur te bevroren en te ontdooien en dan te filteren.

HENRY en HATCH ⁹⁾ gebruikten een antigeen, verkregen door gefractioneerde praecipitatie van verschillende proteïnen bij hun iso-electrisch punt, na de bacteriën ontvet te hebben met petroleum-aether en zoutzuur. Slechts één van de 50 verkregen fracties was specifiek. PINNER ⁹⁾ verkreeg echter in een naonderzoek zeer onbevredigende resultaten.

BONACORSI ⁹⁾ trachtte de ervaringen, met de verschillende lues-reacties opgedaan, ook voor de tuberculose te gebruiken: hij nam als antigeen de op eiervoedingsbodem gegroeide bacillen, die hij daarna 3 dagen lang met absolute alcohol extraheerde. Tenslotte werd een bepaalde hoeveelheid cholesterine toegevoegd. KOVATS meende bij de reactie met dit antigeen met een onspecifieke uitvlokingsreactie te doen te hebben, waarbij de cholesterine het actieve agens zou zijn. Hij maakte met de methode van BONACORSI een gecholesteriniseerd extract uit bijenwas, waarmee hij minsten even goede resultaten kreeg!

Meer levensvatbaarheid had het antigeen, door BESREDKA in het Institut Pasteur bereid (1913), in 1921 gewijzigd ²²⁾; hij gebruikte evenals BONACORSI een eiervoedingsbodem en wel gemaakt van eidooiers. Hij deed dit als volgt: van 20 eieren werden de dooiers in een kom gedaan en met 1 L. gedistilleerd water gemengd. Daarna werd toegevoegd 175 cc. 1% Na OH-oplossing, om het geheel doorzichtig te maken. Vervolgens met aq. dest. aangevuld tot 7 L., in kleine flesschen overgegoten en 20 min. bij 110° gesteriliseerd. Na 4 dagen zijn de cultures reeds voldoende, om het antigeen te bereiden. Dan wordt 30 min. in stroomende stoom gesteriliseerd. Na 24 uur zijn de bacillenlichamen gesedimenteerd. De bovenstaande vloeistof wordt afgegoten, de bodemrest gecentrifugeerd en het sediment in enkele cM.³ physiologische zoutoplossing opgenomen en 2—3 uur lang geschud. De gebruikte oplossing is gewoonlijk een verdunning van 1/40.

BESREDKA gebruikt hier dus een zeer jeugdige cultuur van meestal nog niet zuurvaste bacillen. Bovendien kweekt hij op een voedingsbodem, die veel lecithine bevat (eidooier), dat bij complementbindings-reacties de gevoeligheid van het antigeen zeer verhoogt. Met dit antigeen zijn talloze onderzoekingen verricht met wisselend resultaat, waarover later meer.

BESREDKA gebruikte dus wel den volledigen bacil, doch zorgde er

voor, deze zeer jong te gebruiken vóór de gewone, voor de specifieke reacties zeer hinderlijke, zuurvastheid was opgetreden.

In 1935 heeft BESREDKA ⁶⁸⁾ weer een modificatie aangegeven, waardoor het antigeen nog gevoeliger geworden is: de cultures worden verkregen door ze te kweken in eidooier in alkalisch milieu gedurende 45 dagen. BESREDKA laat hier dus het voordeel, dat verbonden is aan het gebruik van jeugdige cultures, die immers reeds door hun jeugd minder zuurvast zouden zijn en waarvan hij in 1913 hoog opgaf, varen. Toch krijgt hij een gevoeliger antigeen. Het autolysaat van deze cultures, dat complement bindt met serum van tuberculoselidjers, is thermostabiel. Hij bewaart het met 1 deel alcohol 95% op 5 deelen antigeen.

BRONFENBRENNER ⁶⁹⁾ wilde onderzoeken welken invloed de lipiden op het tot stand komen der reactie hadden en verwijderde daarom de lipiden uit het BESREDKA-antigeen zoo goed mogelijk door extractie met aether. Het antigeen bleef daarna even werkzaam, het aantal onspecifieke reacties verminderde. De aanwezigheid der lipiden was dus een ongunstig werkende factor.

Hij raadt later aan, getroffen door het groote aantal sera met positieve tuberculosereactie en tevens positieve lues-WASSERMANN, iedere zending van het antigeen met aether te extraheeren, daar de hoeveelheid lipiden sterk wisselt en een zeer hoog lipoidgehalte toename van het aantal onspecifieke reacties veroorzaakt ⁷⁰⁾.

Door andere onderzoekers werd een geheel andere weg gevolgd, om de nadeelen der zuurvastheid te ontgaan, n.l. door de tuberkelbacillen te extraheeren met verschillende oplossingsmiddelen.

COOKE, WILSON, v. WANG en CROCKET ⁹⁾ maakten een antigeen door extractie met alcohol en aether, de laatste ook met chloroform en daarna de bacillenrest te suspendeeren in zoutoplossing.

(Gezien in het licht van latere onderzoekingen en het vinden der phosphatiden met hun sterke antigeen-eigenschappen, was de methode om de bacillen met alcohol en aether te extraheeren niet juist. Ook komt in het alcohol-aether-extract een polysaccharide voor, dat als haptene sterk werkzaam gebleken is) ³⁴⁾. Eenige der belangrijkste, bij de specifieke reacties werkzame stoffen, werden op deze wijze verwijderd. PINNER ⁹⁾ heeft dan ook geconstateerd, dat het antigeen van WANG en CROCKET inert was.

Chloroform daarentegen is het beste oplossingsmiddel voor de wassubstantie der bacillen en het is gebleken, dat deze eveneens antigene eigenschappen bezit (PEDERSEN-BJERGAARD ⁴⁴⁾), zoodat door de onderzoekers, die de bacillen ook met chloroform behandelen, al weer een werkzaam bestanddeel wordt weggenomen.

SCHLOSZBERGER ⁹⁾ extraheerde met aceton, aethyl-alcohol en chloroform.

BLUMENTHAL ⁷¹⁾ kweekt de bacillen, behandelt ze 4 weken lang met aceton, daarna met aether om de lipoiden te verwijderen, vervolgens extraheert hij met aq. dest., waaraan een kleine hoeveelheid carbol is toegevoegd. Ook deze onderzoekers doen dus alles, om de in hun oog storende lipoiden kwijt te raken.

Grooten opgang maakte in den aanvang het antigeen van WASSERMANN ⁷²⁾, hetgeen op zeer natuurlijke wijze voortkwam uit de reputatie van de luesreactie van denzelfden schrijver. WASSERMANN stelde zijn antigeen samen met den wensch, een goede onderscheiding mogelijk te maken tusschen sera van luetische en van tuberculeuze patiënten. Hij ging uit van de volgende overweging: serum van een tuberculose-patient is lipophiel evenals luetisch serum. Het reageert echter in tegenstelling met luetisch serum niet alleen met lipoiden, doch heeft in het antigeen ook eiwitstoffen noodig, die in de tuberkelbacillen zijn opgesloten. Het serum van patienten met een actieve tuberculose heeft minder lipoiden noodig in het antigeen, dan het serum van geïnfecteerde, doch niet-zieke individuen. Actieve tuberculose zal dus een positieve reactie kunnen geven, terwijl inactieve tuberculose dit niet doet.

WASSERMANN wilde met zijn complementbindingsreactie dus een activiteitsdiagnose maken. Het is duidelijk, dat de *hoeveelheid* aanwezige lipoiden hierbij van zeer groot belang was.

Hij ging als volgt te werk: humane tuberkelbacillen werden met tetraline (d.i. tetra-hydro-naphthaline) vermengd tot geen zuurvaste elementen meer aan te toonen waren. Daarna extraheerde hij met aether. Het zoo verkregen lichtgele poeder verwekte bij een schaap complementbindende antilichamen tegen het gebruikte antigeen, tegen een suspensie van tuberkelbacillen en eveneens tegen tuberculine, in vitro evenwel was het onwerkzaam. Om met dit extract bij menschen complementbindende antilichamen aan te toonen, moest lecithine (in zeer kleine hoeveelheden) worden toegevoegd. De bruikbaarheid van dit antigeen was dus volkomen afhankelijk van het toegevoegde lipid.

Volgens KLOPSTOCK ⁷³⁾ dient het lecithine alleen als versterker der reactie. Hij toonde dit op de volgende wijze aan: hij deed absorptieproeven met sterk postief reagerende sera, die hij behandelde met een preparaat van tuberkelbacillen. Indien hij daarna met hetzelfde serum nogmaals dezelfde reactie uitvoerde, bleek deze negatief te zijn geworden. Het bleek nu, dat het lecithine-vrije preparaat van

tuberkelbacillen in staat was, alle antilichamen te binden, die met het lecithinehoudende antigeen de complementbindingsreactie gaven. Hieruit bleek dus, dat het lecithine alleen als versterker der reactie diende.

DIENES en SCHEFF ⁷⁴⁾ vonden, dat lecithine uit den handel de complementbinding tot het 80-voudige versterkte bij de in aceton oplosbare substantie der tuberkelbacillen, en tot het 160-voudige bij de in alcohol oplosbare.

REITER en OGAWA ⁵⁶⁾ maakten op dezelfde wijze als het tuberculose-antigeen door WASSERMANN bereid werd, antigenen uit andere zuur-vaste bacillen, saprophyten, doch constateerden, dat in het algemeen de tuberculosesera met het tuberculoseantigeen vaker een positieve reactie gaven dan met de saprophytenantigenen, zoodat aan het tuberkelbacillen-antigeen een bepaalde specificiteit moest worden toegekend.

Het antigeen van WASSERMAN heeft zich niet kunnen handhaven, tengevolge van een te geringe specificiteit en te geringe gevoeligheid, zooals verderop nog besproken zal worden.

Een der eersten, die ernstige critiek heeft geoefend op het antigeen van W., was onze landgenoot VAN DER HOEDEN ⁷⁵⁾, die ontdekte, dat het tuberkelbacillenpoeder, „in schrille tegenstelling met de opgaven van W.”, bestond uit microscopisch volmaakt gave en volgens ZIEHL-NEELSEN onberispelijk kleurbare staafjes! Daar hij het uit de fabriek betrokken antigeen niet vertrouwde, heeft hij van W. zelf antigeen opgevraagd, dat echter precies dezelfde bevindingen opleverde als het uit de fabriek ontvangene.

Er waren inderdaad belangrijke aanmerkingen op dit antigeen te maken, waarop ook PINNER ⁹⁾ heeft gewezen: het handelsantigeen bevatte vaak nog zuurvaste staafjes, zelfs waren vele ampullen van het antigeen niet gelijkwaardig, en er werd aangetoond, dat het antigeen toch ook zonder lecithine wel complement bond met een zeker aantal tuberculeuze sera. Bovendien toonde PINNER aan, dat het z.g.n. bacillenpoeder van WASSERMANN vrij groote hoeveelheden, in alcohol oplosbare stoffen bevat, die in vitro als antigeen werken. Door langduriger extractie met alcohol gaan 75% der antigene stoffen in de alcohol over. De rest is practisch onwerkzaam en kan ook niet door lecithine geactiveerd worden. Hij besluit hieruit, dat WASSERMANN zijn doel bij de bereiding van dit antigeen gemist heeft, want het is in vitro werkzaam, niet omdat het vrij is van vet, was en lipoiden, maar juist omdat er nog de zeer werkzame, in alcohol oplosbare stoffen in aanwezig zijn! M.a.w. zou het WASSERMANN gelukt

zijn, zijn gestelde doel te bereiken, dan zou zijn verkregen „antigeen” in vitro in 't geheel niet werkzaam geweest zijn!

Het is hierdoor duidelijk geworden, dat men op den verkeerden weg was, toen men door extractie met alcohol, aether of (en) chloroform de daarin oplosbare stoffen ging elimineeren. Immers, zooals PINNER aantoonde en zooals bij het chemische en biologische onderzoek der tuberkelbacillen naderhand steeds weer gebleken is, zijn juist de in alcohol oplosbare stoffen de krachtigste antigenen in vitro, ook de in aceton en aether oplosbare en de in chloroform oplosbare stoffen ontplooiën in vitro hun activiteit. WASSERMANN verwijderde naar zijn meening met de tetraline den wasmantel der bacillen. Dit gedeelte der antigeenbereiding was zeer juist, doch daarna werd, volgens de latere opvattingen, verkeerd te werk gegaan.

De latere onderzoekers hebben dan ook *dezen* weg bewandeld, dat ze als antigenen *die* stoffen uit de tuberkelbacillen gebruiken, die door de z.g.n. lipoid-oplossingsmiddelen (alcohol, aether, aceton,) er uit geëxtraheerd kunnen worden. Ze probeeren eerst, op verschillende wijzen, den wasmantel der bacillen te doorbreken.

PÉTROFF ⁹⁾ bereidde op drie verschillende wijzen drie verschillende antigenen o.a. extraheerde hij fijn verpoederde tuberkelbacillen met methylalcohol. De heldere bovenstaande vloeistof werd als antigeen gebruikt.

BOQUET en NÈGRE ⁷⁶⁾ volgden PÉTROFF na en gebruikten ook methylalcohol voor extractie; vóórbehandeling met aceton; vervolgens worden de bacillen gedroogd, daarna 10—12 dagen in 99% methylalcohol bij 37°. Het filtraat werd als antigeen gebruikt. Dit extract bleek tweemaal zoo gevoelig als een dergelijk extract, doch met aethylalcohol bereid. Een nadeel is, dat het met luetisch serum eveneens zeer sterk reageert, (CALVO, VICENTE en LAGUNA ⁷⁷⁾) hetgeen trouwens BOQUET en NÈGRE in hun eerste uitgebreide bespreking zelf reeds aangeven.

Verder zijn er op soortgelijke wijze antigenen bereid door CRAIG, WOOLLEY en PETRICK, LEONE, WADSWORTH, MALTANER en MALTANER ⁹⁾. Naar aanleiding van het feit, dat toevoeging van kleine hoeveelheden phenol een antigeen veel gevoeliger maakt (zie bv. KLOPSTOCK ⁷⁸⁾), heeft NINNI ⁷⁹⁾ dit geprobeerd en gevonden, dat het methylantigeen daardoor driemaal zoo gevoelig wordt en zijn specificiteit behoudt, en zelfs zesmaal zoo gevoelig wordt, als het een uur na deze toevoeging wordt gebruikt.

BLUMENTHAL ⁷¹⁾ had echter dezelfde gedachte reeds toegepast in 1924 (zie blz. 19).

AUGUSTE⁸⁰⁾ heeft verschillende antigenen (BESREDKA, KLOPSTOCK en NEUBERG, BOQUET en NÈGRE) vergeleken, wat betreft de werking hierop van phenolalcohol. Hij vond steeds een sterke activeering.

In 1926 kwamen NEUBERG en KLOPSTOCK⁸¹⁾ met hun op oorspronkelijke wijze bereid antigeen. NEUBERG had gevonden, dat z.g.n. hydrotrope zouten van organische zuren in staat zijn, om stoffen, die onoplosbaar zijn in water, wel oplosbaar te maken. Zoo bereikte hij met een oplossing van benzoëzure natrium en salicylzure natrium, dat vooral proteïnen, lipoiden en vetten in waterige oplossing overgingen. Ze behandelden dus de bacillen met deze stoffen ter verwijdering van de waslaag en oplossing der antigene bestanddeelen. Ze achtten het verkregen antigeen verregaand specifiek en ook hierom zoo belangrijk, omdat de bereidingswijze zoo eenvoudig was. (LYDIA RABINOWITCH-KEMPNER⁸²⁾ achtte het gelijkwaardig aan het antigeen van BESREDKA).

Later hebben deze onderzoekers de bacillen eerst behandeld met epichloorhydrine (= chloorpropyleenoxyd), dat de zuurvastheid opheft.⁸³⁾ Als eenige reden, waarom ze de vroegere bereidingswijze hebben laten varen, deelen ze mede, dat de resultaten met dat extract hun niet voldaan hebben.

Daarna wordt geëxtraheerd met absolute alcohol. Aan dit preparaat wordt dan nog een minimale hoeveelheid van op zich zelf onspecifiek werkende wassubstantie der tuberkelbacillen toegevoegd, waardoor de werkzaamheid verhoogd wordt. De ervaringen met dit antigeen waren gunstig, zoodat het nog steeds gebruikt wordt.

In 1931 maakten WITESKY, KLINGENSTEIN en KUHN^{28) 60)} een nieuwe complementbindingsreactie bekend met een op origineele wijze vervaardigd antigeen. Daar de resultaten van mijn onderzoekingen verkregen zijn met dit antigeen, zal ik hier wat uitvoeriger op ingaan.

Ze gingen uit van de overweging, dat de tot nu toe meest gebruikte antigenen over het algemeen met alcoholextractie waren verkregen, evenals het lues-antigeen door alcoholextractie van dierlijke organen verkregen is. Beide bevatten dus veel lipoiden. De luesreactie (WASSERMANN) is juist van deze lipoiden afhankelijk. De onspecificiteit der tuberculosereacties ten opzichte van lues zou dus af kunnen hangen van de te groote hoeveelheid lipoiden in het tuberculoseantigeen. De Schrijvers wilden daarom probeeren, de lipoiden uit de bacillen te verwijderen. Hiervoor moest ook worden nagegaan, of de bacillen na extractie met alcohol nog een antigene functie bezaten, eventueel op welke wijze ze geëxtraheerd moesten worden, zoodat dit extract een goed antigeen zou opleveren.

Het bleek, dat na extractie met heeten alcoholen opvolgende afkoeling een fractie opgelost blijft in den koud geworden alcohol en dat een andere fractie bij de afkoeling neerslaat. Deze laatste fractie bleek als antigeen bruikbaar te zijn dan de eerste.

Wat betreft den invloed van lecithine op de werkzaamheid van hun extract, bleek uit een daarop gericht onderzoek het volgende:

1e. Toevoeging van lecithine aan alcoholische tuberkelbacillen-extracten verhoogt de gevoeligheid, doch aan den anderen kant vermindert de specificiteit van het antigeen.

2e. Een voordeel is echter weer, dat de zelfremmende werking van het extract verminderd wordt.

Volgens de onderzoekingen van BENDIEN, NEUBERG en SNAPPER ⁸⁴⁾ die de proeven van KÜRTEN ⁸⁵⁾ herhaalden, heeft toevoeging van 1 pro mille lecithine aan het citraatbloed een sterk verlagenden invloed op de bezinkingssnelheid der roode bloedlichamen. Dit komt waarschijnlijk, doordat lecithine de grensvlakspanning: plasma-roode bloedlichaam, zeer sterk vermindert en zodoende de stabiliteit van de emulsie zeer sterk verhoogt. We kunnen dus zeggen, dat de lecithine de factoren, die de verhooging der bezinkingssnelheid veroorzaken, tegenwerkt, terwijl de factoren, die de complementbindingsreactie bevorderen, gunstig beïnvloed worden. Op deze wijze heeft de toevoeging van lecithine dus nog een derde voordeel, doordat de invloed der serumlabiliteit op den uitslag der complementbindingsreactie beperkt wordt. Lecithinetoevoeging heeft dus belangrijke voordeelen en de schr. hebben deze dan ook voor hun extracten willen toepassen. Toen drong te meer de noodzakelijkheid, de specificiteit, die hierdoor gedeeltelijk verloren ging, op andere wijze weer terug te krijgen, zoo mogelijk te verbeteren. Daarom werd als volgt te werk gegaan:

Gedroogde tuberkelbacillen werden in alcohol gekookt, afgekoeld, en gefiltreerd. Ze hielden hierbij dus de bovenbedoelde, in heeten alcohol oplosbare, doch bij afkoeling praecipiteerende fractie over, terwijl de zich in den kouden alcohol bevindende stoffen verwijderd werden. De filterrest werd met kouden alcohol geëxtraheerd, de hierin opgeloste stoffen nogmaals verwijderd, de rest met heete pyridine (een benzolderivaat, dat na een reeks onderzoekingen het geschikt bleek) geëxtraheerd. Het pyridine-extract werd ingedampt, nog eens met aceton gezuiverd en in benzol opgelost. Daarna werd nog een kleine hoeveelheid lecithine toegevoegd, om de gevoeligheid van het antigeen te verhoogen. Door de extractie met koude alcohol is dus een groot deel der stoffen, die de lues-WASSERMANN positief maken, verwijderd. Het voordeel van het gebruik van pyridine is, dat deze stof een zeer

krachtig oplossingsmiddel is, zoodat slechts weinig antigeen gebruikt behoeft te worden. Verder is een belangrijk voordeel, dat het antigeen in een zoo sterke verdunning (2%) gebruikt kan worden, waardoor het eiwit van het serum nauwelijks neerslaat.

Door bindingsproeven werd bewezen, dat de reactie met dit antigeen in serum van tuberculosepatienten een echte antigeen-antilichamen-reactie is.

Over de specifieke stof, die in het antigeen van WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN werkzaam is, heeft EYER ⁸⁶⁾ belangwekkende proeven genomen. Het is bekend, dat de in kouden alcohol oplosbare bestanddeelen van het antigeen in serologisch opzicht practisch onwerkzaam zijn. De specifieke antigeenfunctie is verbonden aan de in aceton en kouden alcohol onoplosbare fractie. Een onder inachtneming van de voorschriften van MEYER en ANDERSON vervaardigde, gezuiverde phosphatidefractie uit tuberkelbacillen (onoplosbaar in alcohol en aceton) bleek serologisch werkzaam te zijn, hetgeen door toevoeging van lecithine nog versterkt werd, zonder dat EYER er in slaagde de gevoeligheid van het antigeen van W. K. en K. *) te bereiken. Hij concludeert, dat de kern der specifieke antigeenfunctie in het antigeen van W. K. en K. ligt in een phosphatide, onoplosbaar in alcohol, en dat de vervaardigers van het antigeen er blijkbaar in geslaagd zijn, een bijzonder gelukkig mengsel te vinden met geschikte, hierbij gemengde stoffen.

Een enkele onspecifieke reactie van sera met positieve WASSERMANN kon worden uitgeschakeld door verhooging der inactiverings-temperatuur tot 60°—62°. Lipoidantilichamen gaan door verwarming eerder te gronde dan andere antilichamen. Luetisch serum reageert na verhitting tot hogere temperaturen heel spoedig niet meer. LAVAL (1924, naar Wit. Kl. en K.) gebruikte deze waarneming reeds, om door middel van het antigeen van BESREDKA tuberculose- en luessera te scheiden.

De *bereidingswijze* van dit antigeen is dus als volgt: 1 gewichtsdeel gedroogde tuberkelbacillen wordt met 20 volumedeelen 96% alcohol 2—3 uur lang onder terugvloei-koeling geëxtraheerd. Deze massa wordt, na urenlange afkoeling in een koud mengsel, gefiltreerd; de filterrest op het oliebad met heete pyridine in de SOXHLET volledig geëxtraheerd. Het pyridine-extract wordt ingedampt en de droogrest komt nog eens met aceton in de Soxhlet. Het in aceton onoplosbare gedeelte wordt gedroogd en dan in 1% benzoloplossing opgenomen.

*) Afkorting voor: WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN.

Vervolgens wordt 0.3—0.6 volumedl. 1% alcoholische oplossing van lecithine-Merck ingedampt en de rest in één vol. deel van de 1% benzoloplossing van het tuberkelbacillen-extract opgenomen. Voor serodiagnostisch gebruik kan de zoo verkregen stamoplossing met benzol tienmaal verdund worden.

Vóórdat men de reactie gaat uitvoeren, moet de 0.1% benzol-oplossing ingedampt worden en de rest in de dubbele hoeveelheid physiologisch zout worden opgenomen.

MOEILIKHEDEN VAN HET SEROLOGISCH ONDERZOEK DOOR DE AFZONDERLIJKE PLAATS, DIE DE TUBERCULOSE ALS INFECTIEZIEKTE INNEEMT.

Hoewel dit in de laatste jaren veel minder het geval is dan vroeger, toen de tuberculosebestrijding zich nog niet zoo had ontwikkeld als thans, is het nog steeds voor een zeer groot percentage der menschen een feit, dat ze, meestal in hun jeugd, met tuberkelbacillen geïnfecteerd worden.

HEYNSIUS VAN DEN BERG geeft in zijn Clinische les van 7 Maart 1936 in het N. T. v. G. een tabel, die hierop betrekking heeft:

Positieve Pirquet-reactie op het Amsterdamsche Districtsconsultatie-bureau onder personen, die, voorzoover bekend, geen contact hadden met een lijder aan open longtuberculose.

1—2	3—4	5—6	7—10	11—14	15—19	jaar
18.8	22.5	25.4	35.6	46.5	65	%
20—29	30—39	40—49	50—59	60—79	jaar	
81.5	91.0	90.0	87.0	83.5	%	(1930—1932)

Men moet zich voorstellen, dat door de eerste infectie reeds de vorming van antilichamen wordt opgewekt. Evenals het nu bij de diagnose van den typhus abdominalis met de agglutinatiereactie uiterst hinderlijk kan zijn, indien de patient vroeger met typhusvaccin is ingeënt, — het bloedserum van een dergelijke patient behoudt zeer lang de eigenschap, typhusbacillen te agglutineeren —, moet men het voor mogelijk houden, dat de eerste of een latere infectie met tuberkelbacillen, al heeft deze infectie geen ernstig ziek-zijn tengevolge, antilichamen verwekt, die naderhand storend kunnen werken bij het verrichten der specifieke reacties. In verreweg de meeste gevallen zal echter het tijdstip der infectie reeds lang achter den rug zijn, en zal de hoeveelheid antilichamen zoo gering zijn, dat men er geen last van zal ondervinden.

Het tweede belangrijke feit, waarvan zeer veel voor de betrouwbaarheid der reacties afhangt en waarover de meeste schrijvers het eens zijn, is, dat in sommige stadia der tuberculeuze infectie zoo goed als geen antilichamen aanwezig zijn.

In de eerste plaats moet in dit verband genoemd worden het eindstadium der ziekte, waarin het organisme zoo uitgeput zou raken, dat zelfs de productie van antilichamen wordt gestaakt. KLINGENSTEIN⁸⁷⁾ is het hier niet geheel mee eens en bewijst, dat er zelfs na den dood nog antilichamen gevonden kunnen worden. Van 20 patiënten die geregeld serologisch onderzocht werden, hadden 13 tot hun dood toe een hoog gehalte aan antilichamen. Zelfs in lijkenbloed werden nog tuberculose-antilichamen gevonden.

Althans in een deel der gevallen kan men echter rekening houden met een negatieven uitslag: waarschijnlijk tengevolge van den uitgeputten lichamelijken toestand, dus een zgn. „cachexiereactie”.

Doch dan zijn er gedurende de ziekte nog stadia, waarin geen antilichamen zouden voorkomen, althans niet aantoonbaar zouden zijn, en wel in het 1ste en vooral in het 2e stadium (vgl. RANKE), het generalisatiestadium (KLINGENSTEIN⁸⁷⁾, ERNST⁸⁸⁾, LOBEN en GLAUM⁸⁹⁾. RANKE zelf verklaart uitdrukkelijk het volgende: „wir werden also nicht fehlgehen, wenn wir den Einbruch von toxischen Substanzen, die ja stets zusammen mit den Bacillen in das Gefäßsystem einbrechen werden, auch für die spontanen Reaktionen vom sekundären exsudativen Typ verantwortlich machen.” En verder: „Wir haben damit die Vorstellung eines zweiten Stadiums gewonnen, indem zu der fortbestehenden Ausbreitung auf dem Lymphweg noch die haematogene und intrakanalikuläre Metastasierung hinzutreten etc.”⁹⁰⁾.

De bedoeling van deze aanhaling is, dat het volgens RANKE hierbij dus gaat om een overstrooming van het bloed met stoffen der tuberkelbacillen, waarbij zich vanzelfsprekend ook antigenen zullen bevinden.

In dit stadium krijgen we dus een binding der antilichamen, die dan dus wel aanwezig, doch niet aantoonbaar zijn.

Bovendien zijn bij tuberculose van de huid en van het bot slechts in een klein percentage positieve reacties aantoonbaar (WITEBSKY⁹¹⁾).

GUDEHUS⁹²⁾ maakt de zeer juiste opmerking, dat we van de serologische reacties bij tuberculose niet het onmogelijke mogen eischen. We weten immers, dat een complementbindingsreactie berust op de aanwezigheid van antilichamen. We weten echter niet, of er in iedere phase van de ziekte zulke antilichamen aanwezig zijn, evenmin of de antilichamen nog blijven bestaan na genezing der

tuberculose. Zoolang deze vragen onopgelost zijn, is het onmogelijk, om precies te zeggen, wat we voor de diagnose van de complement-bindingsreactie mogen verwachten. De schrijver is het in het geheel niet met KLINGENSTEIN eens, doch vond bij nieuwe pulmonale haarden en bij haematogene extrapulmonale uitzaaiing evenveel positieve als negatieve reacties.

De longtuberculose der volwassenen vertoont wel in het meerendeel der gevallen een positieve reactie, doch volgens KLINGENSTEIN is er steeds minstens een zesde deel negatief. (Onze cijfers zien er nog geheel anders uit, waarover straks meer gezegd zal worden).

KLINGENSTEIN ⁸⁷⁾ meent een soort oplossing te hebben gevonden voor het voorkomen van negatieve reacties bij sommige tuberculose-patienten door het volgende, door hem beschreven geval: „Een jarenlang klinisch en serologisch onderzocht geval kwam ter obductie. (17 maal was een negatieve reactie gevonden). In plaats van de verwachte banale tuberculose werd echter een zóó sterke verkazing der hilusklieren gevonden, als bij tuberculose nooit gezien wordt, zoodat de patholoog-anatoom de aandoening als niet-tuberculeus verklaarde. *) Bij het nagaan van de seronegatieve gevallen bleek toen inderdaad bij verscheidene gevallen een aandoening der hilusklieren te bestaan. Het waren meestal jonge mensen, de aard der ziekte kwam ongeveer overeen met wat genoemd wordt: „juvenile tuberculose”.

Het is zeer lastig om de niet-reageerende gevallen van tuberculose in een bepaald schema te rangschikken, doch over het algemeen schenen gevallen, waar naast de longaandoening een haematogene tuberculose van andere organen bestond, of waar de longaandoening een onderdeel was van de haematogene uitzaaiingstuberculose, negatief te reageren. (Zie ook ⁹³⁾. LOBEN en GLAUM ⁸⁹⁾ staan op het volgende standpunt: zoolang bij een longtuberculose met versche infiltraten de reactie negatief uitvalt, is het mogelijk, dat er nieuwe metastasen optreden; m.a.w. zij draaien de zaak om en leiden uit de negativiteit der reactie af, dat er haematogene uitzaaiing, of de neiging daartoe bestaat.

*) Wat KLINGENSTEIN met dit voorbeeld precies wil zeggen, is mij niet duidelijk. Vermoedelijk bedoelt hij, dat dit geval zelfs voor den patholoog-anatoom zoo raadselachtig was, dat ook deze de diagnose tuberculose slechts met moeite kon stellen, zoodat het niet behoeft te verwonderen, dat de serologische reactie op tuberculose negatief uitviel. Het is mij echter niet mogelijk in te zien, wat dit geval zou kunnen bewijzen.

HORSTER ⁹⁴⁾ zegt: „Hoher Antikörpertiter im Blute und haematogene Aussaat schlieszen sich im allgemeinen gegenseitig aus“. KUMAGAI, IIBUCHI en OGAWA kwamen tot dezelfde conclusie (gecit. naar Horster).

Men kan hierbij met labiliteitsreacties wel een positief resultaat vinden, terwijl men met antilichamenreacties een negatieven uitslag krijgt. In zulke gevallen kan immers de colloïdlabiliteit van het bloed groot zijn, hoewel antilichamen ontbreken of niet aantoonbaar zijn.

WITEBSKY en KLINGENSTEIN ⁹⁵⁾ verklaren dan ook: „An einer Beziehung zwischen dem Auftreten spezifischer Antikörperfunktionen im Serum und den verschiedenen Krankheitsphasen der Tuberkulose ist demnach wohl kaum zu zweifeln“.

BRANDT en V. AICHBERGEN ⁹⁶⁾ vatten nog eens samen, welke stadia der tuberculose invloed hebben op den uitslag der reactie: een versterking der complementbindingsreactie treedt volgens hen op:

1. gelijktijdig met ontwikkeling en uitbreiding in het begin der ziekte.
2. na vaccinatie met levende tuberkelbacillen.
3. na tuberculinebehandeling.
4. na het aanleggen van een pneumothorax.

Een verzwakking der reactie is volgens hen te verwachten:

1. bij overgang in genezing.
2. bij kwaadaardige progrediente gevallen.
3. bij haematogene uitzaaiingen.
4. bij het optreden van een exsudatieve pleuritis.

Deze samenvatting komt wel ongeveer overeen met wat onze eigen bevindingen ons geleerd hebben.

GOLASZWESKA en SKIBINSKI ⁹⁷⁾ verkondigen echter op grond van een onderzoek bij slechts 22 gevallen van longtuberculose, dat primaire infiltreringen en haematogene vormen meestal positief zijn. Deze uitspraak is zoozeer in strijd met de resultaten van anderen, dat we ze als een gevolg van het te geringe aantal observaties beschouwen.

MOEILIJKHEDEN VAN MEER ALGEMEENEN AARD, DIE DE SEROLOGISCHE TUBERCULOSEREACTIE BEINVLOEDEN.

De grootste moeilijkheid bij de bereiding van alle antigenen is steeds geweest: het bereiken van een zoo groot mogelijke gevoeligheid en tevens een zoo groot mogelijke specificiteit.

Lipoidfactor.

Verhoogt men b.v. bij de tuberculose reacties de gevoeligheid door veel lipoiden aan het antigeen toe te voegen, dan wordt de specificiteit ten opzichte van luetische sera bedenkelijk veel geringer. Het antigeen van WASSERMANN is hiervan een geschikt voorbeeld. WASSERMANN had door lecithine-toevoeging de gevoeligheid sterk verbeterd, doch de specificiteit had sterk geleden! Het is een gebrek, dat bij vrijwel alle vroeger gebruikte antigenen voorkwam, daar ze eigenlijk allen met alcohol en aether uit de tuberkelbacillen werden geëxtraheerd, om de werkzame stoffen te verkrijgen. Zie ook MEINICKE ⁹⁸⁾.

Bij het onderzoek met al deze reacties wordt dan ook geregeld vermeld, dat een groot percentage der luetische sera een positieven uitslag gaf. Pas het antigeen van WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN heeft dit bezwaar niet, daar het niet die lipoidsubstanties bevat, die juist met luetisch serum reageren.

Serumlabiliteit.

Bij tuberculose treedt een zgn. labiliseering der bloedeiwitlichamen op, een veranderde dispersiteit van de eiwitmoleculen. De klassieke onderzoeksmethode is die van FAHRAEUS ⁹⁹⁾ (1917), waarbij de bezinkingssnelheid der roode bloedlichamen wordt bepaald. Hoewel de waarde van deze methode boven allen twijfel verheven is, is er van eenige specificiteit geen sprake.

De veranderde dispersiteit der eiwitlichamen maakt, dat ze door stoffen, die eiwit neerslaan, gemakkelijker neergeslagen worden. Al die tuberculose reacties, die uitvlokingsreacties zijn (DARANYI, MATÉFY, COSTA, VERNES), zullen daarom gemakkelijk een positieven uitslag kunnen geven, als de labiliteit van het bloedserum verhoogd is. Doch ze zullen evengoed positief uit kunnen vallen, als de labiliteit verhoogd is door een andere oorzaak dan een infectie met tuberculose. Zullen ze dus in enkele gevallen b.v. bij beentuberculose met een verhoogde bezinkingssnelheid en dus verhoogde labiliteit van het bloedserum, vaker een positieven uitslag geven, dan een antilichamen-reactie, het tekort aan specificiteit maakt die reactie als differentieel-diagnosticum onbruikbaar. Immers ook een longtumor zal met deze uitvlokingsreacties een positieven uitslag geven door de sterk verhoogde serumlabiliteit.

Doch niet alleen die reacties, die als uitvlokingsreacties bedoeld zijn, geven teveel aspecifieke resultaten. Ook de antigenen, die met alcohol zijn bereid, een precipitatiemiddel bij uitstek voor eiwitten,

zullen de colloïde samenstelling van het te onderzoeken serum zoodanig kunnen beïnvloeden, dat onzuiverheid der reacties ontstaat.

Latentie tijd.

Bij alle infectieziekten, ook bij de tuberculose, verloopt eenige tijd na de infectie, voor zich antilichamen hebben gevormd.

BESREDKA en MANOUKHINE ¹⁰⁰⁾ toonden bij caviae aan, dat reeds op den 4en dag na de subcutane injectie van tuberkelbacillen antilichamen aanwezig waren.

BESREDKA ¹⁰¹⁾ beschreef, hoe hij een serie konijnen op verschillende wijzen heeft ingespoten: intraveneus, intraperitoneaal, subcutaan en intraduraal. Hij gebruikte humane en bovine tuberkelbacillen.

Bij intraperitoneale noch bij subcutane injectie van bovine bacillen werden antilichamen in het serum gevonden.

Na injectie van humane tuberkelbacillen traden de antilichamen op verschillende tijdstippen na de injectie op:

a) bij intraveneuze injectie zijn na 20 dagen antilichamen aan te toonen, die 15 dagen blijven bestaan. De dieren sterven in de 2e maand.

b) bij intraperitoneale injectie zijn antilichamen na 16 dagen aantoonbaar, toenemend tot den 60en dag, daarna van den 70en tot den 100en dag niet meer, en opnieuw tot den 135en, waarna de dood intreedt.

c) bij subcutane injectie: antilichamen na 16 dagen, op hetzelfde peil gedurende 2 maanden, op 70en dag afwezig, op den 100en dag gedeeltelijk weer aanwezig, hetgeen tot den dood, op den 135en dag, duurt.

d) bij intradurale injectie: na 3 maanden dood, in het begin van de 2e maand gedurende korten tijd een zwak positieve reactie op antilichamen, verder steeds negatief.

Ook BIJL en VAN DER HOEDEN ¹⁰²⁾ komen naar aanleiding van hun desbetreffende onderzoekingen bij geiten tot de conclusie, dat van 9 tot 28 dagen na de infectie antilichamen in het bloed aantoonbaar zijn. Verder merkten zij nog op, dat 8 weken na verwijdering van een actieve tuberculeuze haard de aanvankelijk positieve reactie van BESREDKA negatief geworden was.

Hoewel deze resultaten natuurlijk allerminst voor menschen kunnen gelden, zijn ze toch een aanwijzing, dat er eenige tijd verloopt, vóór antilichamen optreden (evenals dit bij bv. de typhus overbekend is).

De genoemde proefnemingen werden verricht met intraveneuze, intraperitoneale, subcutane en intradurale injecties van tuberkelbacillen. Infectie via de ademhalingswegen brengt minder ernstig

direct contact met den ziekteverwekker, zoodat de latentietijd bij een op die wijze verkregen infectie nog wel langer zou kunnen zijn. Hoewel het niet waarschijnlijk is, dat deze latentietijd een belangrijke factor zal zijn bij het opsporen van tuberculosegevallen, komt het mij toch voor, dat er rekening mee gehouden moet worden.

A n a m n e s t i s c h e r e a c t i e s .

Het is bekend, dat na het doorstaan van typhus opnieuw een sterke agglutinatiereactie in het bloed gevonden kan worden, als de patient vele jaren later een andere infectieziekte krijgt. De functie der antilichamenproductie wordt dan weer geprikkeld, waardoor niet alleen tegen de nieuwe ziekteverwekkers antilichamen optreden, doch ook weer tegen typhusbacillen.

Op het bestaan van dergelijke „anamnestische reacties” berust ook gedeeltelijk het succes der aspecifieke eiwittherapie, waarbij door het inbrengen van aspecifieke antigenen het geheele apparaat der antilichamen-productie uit haar latentie gewekt wordt.

Juist bij de tuberculose kan deze „anamnestische reactie” ons parten spelen, doordat vrijwel iedereen op latere leeftijd met tuberkelbacillen geïnfecteerd geworden is. Meestal zal de infectie overwonnen zijn en zullen specifieke antilichamen nauwelijks meer worden geproduceerd, maar dan bestaat de kans dat bij een willekeurige andere infectie, behalve de voor die infectie specifieke antilichamen, ook opnieuw tuberculose-antilichamen gaan optreden.

G e b o n d e n a n t i l i c h a m e n .

KLOPSTOCK⁹⁾ heeft, naar aanleiding van het voorkomen van negatieve serologische reacties, opgemerkt, dat deze antilichamenreacties slechts een overschot aan antilichamen kunnen aantonen. Immers de gebonden antilichamen kunnen niet meer meereageeren.

Treden er door de een of andere oorzaak veel antigene stoffen in circulatie, dan zal de hoeveelheid antilichamen — althans tijdelijk — dermate kunnen verminderen, dat de reactie negatief wordt.

Hier moeten we de aandacht vestigen op het groote aantal negatieve tuberculosereacties, dat voor zou komen in het z.g.n. 2e stadium van RANKE, waarop ik reeds eerder gewezen heb. Hier wordt de bloedbaan overstroomd met antigeen en de antilichamen worden gebonden.

NEUFELD¹⁰⁰⁾ zeide ook reeds in 1921, dat bij de tuberculose een evenwichtstoestand ontstaat tusschen antilichamen en verwekkers. Want, ontstond er een absolute immuniteit, dan zou de tuberculose

geen chronische, maar een acute infectieziekte zijn en de tuberculose zou een kinderziekte zijn evenals de mazelen.

R e m m e n d e i n v l o e d e n.

Het voorkomen van remmende factoren verdient ook bij de tuberculosereactie belangstelling.

In 1910 hebben CALMETTE en MASSOL ¹⁰⁴⁾ ontdekt, dat sommige sera van patienten en van sterk-geïmmuniseerde dieren de binding van het complement kunnen verhinderen, en dat ze dit zelfs doen bij andere sera. Het serum bevat dus een, wat zij noemen „substance inhibitrice”. Bijvoorbeeld: als men het antigeen B₁ samenbrengt met serum van een zeer sterk geïmmuniseerd rund, eventueel met 0.5 cc. paardenserum, dat antilichamen bevat, treedt geen complementbinding op.

Dit is een zoo interessant verschijnsel, dat ik er wat dieper op in wil gaan. Dezelfde schrijvers vonden, dat deze „substance inhibitrice” werkt, zolang antigeen en paardenserum het complement nog niet gebonden hebben; is het complement eenmaal gebonden, dan kan het aldus werkende serum het complement niet weer losmaken. Ze hebben zich toen afgevraagd, of de reactie der „substance inhibitrice” het resultaat kon zijn van een teveel aan antilichamen.

WITEBSKY en KLINGENSTEIN ¹⁰⁵⁾ achten dit (in 1933) waarschijnlijk, en veronderstellen, dat het een phenomeen betreft, dat bij de complementbindingsmethoden bekend staat als „Überschuszhemmung”.

CALMETTE verwerpt echter deze veronderstelling op grond van meerdere waarnemingen:

1e. het serum van RUPPEL en RICKMANN *), zeer rijk aan antilichamen, heeft nooit de eigenschap van „inhibitrice”.

2e. de sera met deze eigenschap geven de antilichamen, die ze naast de „substance inhibitrice” bezitten, niet vrij dan nadat ze in contact worden gebracht met een hoge dosis van een geschikt antigeen, b.v. zijn antigeen B₂ **). De complementbinding kan dus wel optreden, als de geheele „substance inhibitrice” verzadigd is door dit antigeen.

3e. De „substance inhibitrice” kan van de antilichamen worden gescheiden door verdunning met aqua dest., gecombineerd met doorleiding van CO₂: de globulinen, waarin de „subst. inh.” aanwezig is, slaan dan neer; de heldere vloeistof boven het sediment bevat alleen

*) Zie blz. 5.

**) Zie blz. 16.

de antilichamen, met antigeen B_1 kan men in geen enkele der verkregen fracties antilichamen aantoonen, met het B_2 vindt men sporen van antilichamen in het neerslag, doch in de bovenstaande vloeistof vindt men ze zeer duidelijk. Deze laatste bevat de „subst. inhib.” dus niet. Mengt men het neerslag weer met de vloeistof, dan komt de remmende werking weer te voorschijn. Deze kan dus niet veroorzaakt worden door een teveel aan antilichamen.

4e. Als men met b.v. het antigeen B_2 een complementbindings-reactie uitvoert in de heldere vloeistof boven het sediment en ook in het oorspronkelijke serum, heeft men van de heldere vloeistof ongeveer driemaal zoo weinig nodig als van het serum, om een gelijke complementbinding te krijgen.

Het merkwaardige is, dat een op dergelijke wijze verkregen neerslag van het serum van een gezond rund of van het serum van RUPPEL en RICKMANN geen remmende werking heeft. De reactie der „substance inhibitrice” is dus specifiek.

CAULFIELD ¹⁰⁶⁾ trachtte dit verschijnsel, dat hij ongeveer gelijktijdig met CALMETTE vond, dan ook te gebruiken voor de diagnose, met volgens hem zelf bevredigende resultaten. Hij geeft daarbij aan, dat deze belemmering der specifieke reactie door de „inhibitin” kan worden opgeheven door de aviditeit van de combinatie antigeen-amboceptor voor het complement te vermeerderen (zooals ook CALMETTE dit met het antigeen B_2 bereikt) of door het serum met physiologische zoutoplossing te verdunnen. CAULFIELD ¹⁰⁷⁾ toont zich in 1925 teleurgesteld over het weinige gebruik, dat van deze „inhibitive reaction” gemaakt wordt, volgens hem geheel ten onrechte. Zelfs in 1934 ¹⁰⁸⁾ blijkt men zich nog slechts in beperkte kring voor deze reactie te interesseeren.

Hoe moet men zich de vorming dezer remmende stof voorstellen?

CALMETTE ¹⁰⁹⁾ geeft de volgende hypothese: de ingespoten bacillen veroorzaken een vermeerdering van de globulinen, die de remmende stof bevatten en die daardoor de complementbinding kunnen verhinderen. CALMETTE is van meening, dat de „substances inhibitrices” in het organisme een beschermende functie uitoefenen bij een massale infectie, op die manier, dat ze een binding van het complement beletten, en zoo het optreden van een anaphylactische shock voorkomen, die volgens BORDET samengaat met een vermindering der hoeveelheid complement. Deze meening zou gesteund worden door het feit, dat de hoeveelheid van deze stof vermindert, als men de sterk geïmmuniseerde dieren niet langer inspuit met bacillen.

De buitengewoon interessante vondst en beschouwingen van

CALMETTE wijzen ons dus ook weer op een nieuwe mogelijkheid, die de complementbindingsreactie bij tuberculose zal kunnen beïnvloeden.

Inanitie.

JUSATZ¹¹⁰⁾ heeft in dierproeven een verbruik van vitamine C waargenomen gedurende de immunisatie. Bij maandenlang vitamine-arm gevoede en kunstmatig tegen paardenserum geïmmuniseerde konijnen werden aanzienlijk minder reduceerende stoffen (ascorbine-zuur en glutathion) in de bijnieren gevonden dan bij niet-geïmmuniseerde dieren. Langdurige vitamine-arme voeding leidt bovendien tot een verlaging van de bactericidie van het bloed¹¹¹⁾. Bij de immunisering werd bij toediening van vitamine C de antilichamentiter honderdmaal zoo groot als zonder die toediening. Men kan zich dus zeer goed voorstellen, dat de hoeveelheid antilichamen bij een tuberculoselijder zal lijden door een tekort aan vitamine-C, zooals dit bij tuberculose zooveel bleek voor te komen (o.a. HASSELBACH¹¹²⁾).

Onspecifieke haemolysinen.

PESCH¹¹³⁾ oppert nog een mogelijkheid, waarom men soms bij een zekere tuberculose een negatieve reactie vindt: uit door hem gedane waarnemingen zou het waarschijnlijk geworden zijn, dat bij een tuberculeuze infectie een vermeerderde hoeveelheid aan schapebloedhaemolysinen voor zou komen. In 1932 blijkt hij de reactie van NEUBERG-KLOPSTOCK om deze reden te hebben laten uitvoeren na binding der eigenhaemolysinen aan schapenerythrocyten, met uitstekend resultaat.¹¹⁴⁾

Men moet ter verklaring van het voorkomen dezer vermeerderde schapebloedhaemolysinen bij de tuberculose toch ook denken aan de mogelijkheid, dat in de tuberkelbacillen het „Forsmannsche antigeen” aanwezig zou kunnen zijn. Dit antigeen is in 1911 door FORSSMANN¹¹⁵⁾ beschreven, die door inspuiting van emulsies van verschillende organen van caviae bij konijnen, haemolysinen tegen schapebloedlichamen kon opwekken. Dergelijke stoffen bleken o.a. ook in vele bacteriën voor te komen. Volgens OSUMI¹¹⁶⁾ bevat het alcoholisch extract der tuberkelbacillen echter niet een dergelijk heterogenetisch antigeen.

Volgens WITEBSKY en KLINGENSTEIN¹¹⁷⁾ is in het dierexperiment gemakkelijk te bewijzen, dat stoffen, die zeker geen z.g.n. „Forssmann'sch antigeen” bevatten, bij immunisatieproeven het gehalte aan schapebloedhaemolysinen soms tot het 3- à 5-voudige doen stijgen. Zij meenen, dat de toeneming der schapebloedhaemolysinen in het serum van tuberculoselijders gemakkelijk op deze wijze verklaard

kan worden. In 1936 wordt hier nog eens een onderzoek aan gewijd door MEO COLOMBO ¹¹⁸⁾, die bij het meerendeel der tuberculoselijders meer schapenbloedhaemolysinen vond dan bij gezonden.

I c t e r u s.

Tenslotte moet de invloed nog besproken worden, die icterus uitoefent en wel speciaal de stuwingsicterus. Het is mij opgevallen, dat de icterische sera vaak zwak positieve, een enkele keer sterk positieve reacties geven, zonder dat er van tuberculose iets te ontdekken is. De verklaring hiervoor kan in het volgende te vinden zijn: de labiliteit van den colloïdchemische toestand van het serum moet zeker van invloed zijn op het tot stand komen der reactie, terwijl daarbij uit den aard der zaak de oppervlaktespanning een rol speelt. Ik zou me daarom voor kunnen stellen, dat de eventueel voorhanden zijnde galzure zouten van het icterische serum van invloed zullen zijn op het tot stand komen van onspecifieke reacties. Het is toch bekend, dat galzure zouten een sterke verlaging van de oppervlaktespanning bewerken. Bij de WASSERMANN-reactie op lues treden eveneens dikwijls onspecificiteiten op bij de uitvoering der reactie met galbevattend bloed, terwijl men ook weet, dat wanneer het bloed vrij geworden is van gal bevattende bestanddeelen, de reactie weer negatief wordt.

SPECIFICITEIT.

Het ideaal van een diagnostische reactie zou natuurlijk zijn, dat men door middel van deze reactie alle ziektegevallen zou kunnen opsporen m.a.w. dat de gevoeligheid maximaal zou zijn, en dat bovendien geen enkele andere ziekte of normaal individu een positieve reactie zou vertoonen d.w.z. dat de specificiteit niets te wenschen over zou laten. Het is echter duidelijk, daar de medische wetenschap geen exacte wetenschap is, en de biologische reacties niet gelijk gesteld kunnen worden met wiskundige formules, dat men een dergelijk ideaal nooit zal kunnen bereiken en dat men hoogstens mag hopen, het eenigszins te benaderen.

In de voorgaande bladzijden zijn reeds verscheidene factoren genoemd, die min of meer belangrijken invloed op de specificiteit en gevoeligheid kunnen hebben.

Ik geloof te mogen voorspellen, dat met het toenemen onzer kennis nog meer factoren bekend zullen worden, die de specificiteit kunnen hinderen. Dan zal het bij verschillende gevallen, die onspecifieke

reacties geven, ons duidelijk worden, waarom dit zoo is en zullen we dit niet meer toeschrijven aan een tekortkoming van antigeen of gebruikte methode.

Nog één punt dient nader besproken te worden, daar het voor alle onderzoekers steeds weer een struikelblok is geweest, n.l. de specificiteit der tuberculosereactie ten opzichte van lues. Streefde men naar een groote gevoeligheid van het antigeen, dan was het bijna zeker, dat een groot deel der luesgevallen meereageerde. (BESREDKA, WASSERMANN, BOQUET en NÈGRE, KLOPSTOCK en NEUBERG). Zooals reeds is vermeld, hebben KLINGENSTEIN, KUHN en WITEBSKY met hun antigeen deze moeilijkheid grootendeels weten op te lossen.

In dit verband wil ik nog even nader ingaan op enkele methoden, die aangegeven zijn, om de onderscheiding van luetische en tuberculose-sera mogelijk te maken. In de eerste plaats moet dan genoemd worden de verzadigingsproef van CASTELLANI, oorspronkelijk voor complement-bindende antilichamen aangegeven door EHRLICH en MORGENROTH *) ¹¹⁹), waarbij het gelukt door binding aan het homologe antigeen, de antilichamen uit het serum te verwijderen. Deze proef moet

*) Deze beschreven hun proeven als bewijs voor de juistheid van de pas verschenen „Seitenkettentheorie” van EHRLICH. Ze bestudeerden de haemolyse van schapebloed door het bloedserum van een geit, die gedurende 8 maanden subcutaan was ingespoten met schapebloedlichaampjes. Het serum van de geit loste de erythrocyten van het schapebloed in vitro snel op. Werd het immuunserum een half uur op 56° verwarmd, dan verloor het zijn werking, doch kreeg deze terug, indien serum van een normaal dier werd toegevoegd. Voor de haemolyse moesten dus ook twee stoffen worden aangenomen, evenals PFEIFFER voor de verklaring der bacteriolyse gedaan had, één specifieke stof met grooteren weerstand, die „immuunlichaam” genoemd werd en één, zeer labiele stof, die „addiment” genoemd werd.

De theorie van EHRLICH was de volgende: heeft een of ander lichaam (toxinen, ferment, gedeelte van een bacteriecel of erythrocyt) de eigenschap, zich met zijketens van het protoplasma te binden, dan wordt de vorming van het betreffende antilichaam mogelijk. Het antilichaam moet die groep bezitten, die in de haptophore, de specifiekbindende groep van het eerstgenoemde lichaam grijpt. De oplosbare stof, die door de inwerking van het toxine enz. ontstaat, moet zich chemisch hiermee vereenigen. Is het lichaam van het begin af oplosbaar, zooals de toxinen, dan verloopt de neutralisatie in oplossing. Is echter dit lichaam niet oplosbaar, doch is het oorspronkelijk een onoplosbare stof, b.v. van een bacteriecel of bloedcel, dan wordt het in het bloed opgeloste antilichaam aan de vloeistof onttrokken en aan de genoemde cellen zelf verankerd. In analogie hiermee moest dus in hun geval het in het geitenserum opgeloste immuunlichaam door de erythrocyten van het schapebloed gebonden worden. De hierop gerichte proeven moesten dus het volgende aantonen: Schapebloedlichaampjes werden met immuunserum samengebracht, dat door verwarming tot 56° zijn haemolyseerende

beschouwd worden als de grondslag voor alle reacties van antigeen met antilichamen. De hierbij optredende binding is specifiek. Deze proeven geven een antwoord op de vraag, die men zich eigenlijk vóór ieder onderzoek op dit gebied moet stellen:

1. bestaan er inderdaad antilichamen?

2. berust de reactie op een echte binding: antigeen-antilichaam?

Van de genoemde proef nu kan men gebruik maken om na te gaan, of een positieve reactie met een tuberculose-antigeen ontstaat door de aanwezigheid van tuberculose-antilichamen, stoffen, die aanleiding geven tot een positieve luesreactie, of van beide tegelijk. Ik heb in twee gevallen deze proeven verricht, waarbij bleek, dat beide antilichamen in hetzelfde serum aanwezig waren.

Nog een andere methode, hoewel minder betrouwbaar, doch gemakkelijker uit te voeren, wordt soms gebruikt, reeds vermeld bij de bespreking der antigenen. In 1930 toonden SACHS en KLINGENSTEIN¹²⁰⁾ aan, dat de onspecifieke lipoidantilichamen, zooals we ze met behulp der verschillende luesreacties in luesserum aantoonen, zich van de meeste specifieke antilichamen door een bijzondere

eigenschap verloren had. Scheidde men dan door centrifugeeren de bloedlichaampjes van de vloeistof, dan zou de vloeistof geen immuunlichaam bevatten, indien de roode bloedlichaampjes het vastgelegd hadden. Om dit te onderzoeken, moest men de vloeistof opnieuw met schapebloedlichaampjes mengen en voldoende „addiment” in den vorm van normaal serum toevoegen. Indien de vloeistof geen immuunlichaam meer bevatte, moesten dan de roode bloedlichaampjes intact blijven. Aan den anderen kant moest onderzocht worden, of het sediment het immuunlichaam bevatte. Het sediment werd in keukenzoutoplossing gesuspenderd en voldoende „addiment” toegevoegd. Was het immuunlichaam gebonden, dan moesten de roode bloedlichaampjes gehaemolyseerd worden.

De proeven verliepen als volgt: 4 c.c. van een 5% suspensie van schapebloed werden gemengd met 1, resp. 1,3 c.c. van het geïnactiveerde serum van de genoemde geit. Het mengsel werd 15 min. bij 40° gehouden en dan gecentrifugeerd. De heldere vloeistof werd afgegoten, met 0.2 c.c. normaal schapebloed gemengd en 0.8 c.c. serum van een normale geit toegevoegd. Na 2 uur bij 37° was geen spoor van haemolyse te zien. Het sediment werd van vloeistof zooveel mogelijk ontdaan, in 4 c.c. physiologische keukenzoutoplossing gesuspenderd en gemengd met 0.8 c.c. serum van een normale geit. Na 2 uur staan bij 37° was volkomen haemolyse opgetreden. Dat er een chemische binding plaats had en geen absorptie, bleek uit proeven met bloed van andere dieren, zoodat b.v. bloedlichaampjes van konijnen of geiten in het geheel geen aantrekkingskracht voor het immuunlichaam bleken te hebben. Met deze proeven hebben EHRLICH en MORGENROTH dus aangetoond, dat het immuunlichaam gebonden kan worden, zoodat het zijn werkzaamheid verliest.

In 1910 heeft CASTELLANI een soortgelijke methode beschreven om de agglutinen uit een agglutineerend bloedserum te verwijderen en sedert dien tijd wordt gewoonlijk gesproken van de „verzadigingsproef van CASTELLANI”.

thermolabiliteit onderscheiden. Na verhitting tot 62° ging de complementbindende werking geheel verloren, terwijl daarentegen eiwitantilichamen, zelfs bij verhitting tot 72°, nog aanwezig waren. WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN ²⁸⁾ verhitten een serum, waarvan ze de positieve reactie aan lues toeschrijven, tot 60°—62° gedurende $\frac{1}{2}$ uur, in plaats van tot 56° en kunnen op deze wijze de luesreactie uitschakelen. (Oorspronkelijke methode van LAVAL (1924).) RENAUX¹²¹⁾ ging op de volgende wijze te werk: het te onderzoeken serum wordt met de 9-voudige hoeveelheid aq. dest. en een kleine hoeveelheid luesantigeen gemengd. Dan wordt CO₂ doorgeleid, tengevolge waarvan euglobuline neerslaat. Dit neerslag wordt in physiologische zoutoplossing opgelost. De vloeistof, welke zich boven het neerslag bevindt, die dus de albumine- en pseudo-globulinefractie bevat, wordt door toevoeging van vast NaCl tot 0.9% gebracht. In tuberculeus serum is het antilichaa'm te vinden in de albumine-pseudoglobulinefractie, niet in de euglobulinefractie. Bij luetisch bloedserum is het antilichaa'm juist in de euglobulinefractie aanwezig. Bij menginfectie vindt men antilichamen in beide fracties.

Zooals bij iedere serologische reactie, moet men dus ook bij die der tuberculose, rekening houden met positieve reacties, die niet met de aan te toonen ziekte in verband staan. Reeds werd het aandeel besproken, dat de lues hierin heeft, ook de rol van diphtherie en lepra werd vermeld, evenals die van anamnestiche reacties en labiliteit van het bloedserum.

In dit verband mag ook genoemd worden, waarop WITEBSKY ¹²²⁾ reeds wijst: 1e. de mogelijkheid, dat, ook zonder dat er sprake kan zijn van het optreden van anamnestiche reacties, tuberculose-antilichamen blijven bestaan. Hierin bestaan groote individuele verschillen.

2e. gezonde mensen, die ingeënt zijn (met B.C.G.) zouden als gevolg daarvan antilichamen in hun bloed kunnen krijgen, in voldoende hoeveelheid om een serologische reactie positief te maken. Wellicht moet met deze mogelijkheid in de toekomst rekening worden gehouden, wanneer een belangrijk aantal personen met B.C.G. behandeld is. Hierbij moeten de volgende publicaties vermeld worden: CALMETTE ¹²³⁾ verkreeg met intraveneuze injecties van groote doses B.C.G. bij paarden een serum, dat buitengewoon rijk was aan specifieke antilichamen, bij runderen en bij konijnen vindt men na subcutane of intraveneuze injecties van B.C.G. slechts minimale hoeveelheden.

In de laatste jaren heeft BAKER ¹²⁴⁾ interessante onderzoekingen gedaan bij konijnen, over den invloed van B.C.G.-injecties op de

hoeveelheid antilichamen. Als antigeen gebruikte hij voor zijn complementbindingsreactie een suspensie van door verwarming gedoodde tuberkelbacillen. De antilichamen ontstonden dadelijk en vermeerderden snel. Op den 10en tot den 17en dag na de laatste injectie was de titer het hoogst, op den 100sten dag waren ze verdwenen. Ze waren echter niet voorgoed verdwenen, want als men b.v. opnieuw vaccineerde, waren na een paar dagen weer evenveel antilichamen aantoonbaar. De antilichamen hadden dus alleen de circulatie verlaten. Deze proeven wijzen er dus op, dat het B.C.G. bij konijnen antilichamen kan verwekken en dat ze in latenten toestand lang aanwezig kunnen blijven.

Hier wil ik ook de onderzoeken van GORTER ¹²⁵⁾ noemen, die na injectie van B.C.G. bij konijnen na een halve tot 6 weken een positieve reactie zag optreden met de antigenen van BESREDKA en van BOQUET en NÈGRE.

Bij menschen gelukte het niet om met B.C.G. antilichamen te verwekken, zooals PARISOT, SALEUR en LÉVY ¹²⁶⁾ in 1930 beschreven. Zij onderzochten bij 55 kinderen, die 1 tot 27 maanden tevoren waren behandeld met een subcutane injectie van 0.01 mg. B.C.G., het bloed met de uitvlokingsreactie v. VERNES, doch vonden geen verschil met normale sera.

Zooals reeds vermeld is, reageeren diphtheriepatienten vaak positief met tuberkelbacillenantigeen, doordat de antilichamen tegen den diphtheriebacil zich kunnen binden met het antigeen uit tuberkelbacillen. De antilichamen, die tengevolge van de diphtherie-infectie zijn ontstaan, blijven zeer lang, vermoedelijk gedurende het geheele leven, aanwezig. Nu zou men zich voor kunnen stellen, dat dergelijke personen ook later nog een positieve reactie met tuberkelbacillenantigeen kunnen vertoonen en op deze wijze de specificiteit der tuberculosereactie in gevaar brengen. Misschien zal in de toekomst ook de actieve immunisering tegen diphtherie, zooals die tegenwoordig op groote schaal plaats heeft, in deze richting kunnen werken.

3e. een tuberculeuze infectie kan geheel ongemerkt verlopen. Reeds eerder wees ik hier op en noemde toen o.a. het percentage van volwassenen, dat in ieder geval door den tuberkelbacil geïnfecteerd is. Een zeer groot gedeelte hiervan zal niets van de tuberculeuze infectie als zoodanig bemerkt hebben, doch deze geduid hebben als griep, bronchitis, enz. Zelfs bij nauwkeurig klinisch en röntgenologisch onderzoek blijkt dan nog vaak niets van de infectie, die toch zonder twijfel moet hebben plaats gehad, hetgeen blijkt uit de positieve reactie van PIRQUET. Ook kunnen tuberkelbacillen worden opgenomen

zonder dat de betreffende personen ziek worden, dus zonder eenige merkbare reactie. Zoo zal dit in vele gevallen plaats kunnen hebben bij verplegend personeel, artsen, assistenten, studenten, die met tuberculoselidiers in aanraking komen. Zeer duidelijk blijkt dit o.a. uit de door HEYNSIUS VAN DEN BERG ¹²⁷⁾ meegedeelde gegevens over de onderzoekingen bij medische studenten aan verschillende universiteiten: gedurende de opleiding stijgt het percentage met positieve PIRQUET bijna tot de 100. En in de mededeeling over zijn formule ter berekening der besmettingskansen met tuberculose op verschillende leeftijd, zegt hij het volgende:

„Wanneer men de besmettingskansen van speciale groepen jeugdige volwassenen nagaat, die, zooals verpleegsters en studenten in de medicijnen, een bijzonder risico loopen, dan blijken deze besmettingspercentages nog aanmerkelijk, soms 10 à 12 maal hooger te zijn (dan de percentages van andere mensen)“.

Men moet dus voorzichtig zijn, met alle reacties, die positief uitvallen, zonder dat men tuberculose kan constateeren, onspecifiek te noemen. Want ten eerste kan er door één der bovenvermelde redenen toch een tuberculeuze infectie hebben plaats gehad en ten tweede kunnen bacterieële infecties als diphtherie en lepra een positieve reactie geven, omdat de verwekkers zoo sterk aan den tuberkelbacil verwant zijn, waarvan reeds bewijzen en onderzoekingen zijn besproken. In deze twee gevallen mag men dus eigenlijk niet spreken van „onspecifieke“ reacties. Want een reactie kan alleen dan onspecifiek heeten, als het antigeen reageert met heterologe antilichamen. Doch bij een positieve reactie met sera van diphtherie- en van leprapatiënten kan men eigenlijk niet spreken van heterologe antilichamen, aangezien deze antilichamen zijn verwekt door zeer nauw verwante antigenen. Uit proeven in deze richting is ook gebleken, dat de tuberculeuze antilichamen gebonden kunnen worden met een antigeen uit diphtheriebacillen ¹²⁸⁾ en omgekeerd, dat tuberculoseantigeen de antilichamen van diphtherie-patiënten kan binden ¹²⁹⁾. Men moet hierbij dus niet spreken van onspecifieke reacties, doch van „onkarakteristieke reacties“ (WITEBSKY en KLINGENSTEIN) ¹³⁰⁾ en den naam: „onspecifieke reacties“ bewaren voor positieve reacties bij gevallen, waarbij van eenig verband met tuberkelbacilleninfectie of van overeenkomst van tuberkelbacillen met den ziekteverwekker, niets blijkt. Onder de „onspecifieke reacties“ zullen zich dus zeer waarschijnlijk nog gevallen verschuilen, waarvan later nog eens zal blijken, dat ze tot de onkarakteristieke en niet tot de onspecifieke reacties behooren.

Merkwaardig zijn in dit opzicht de bevindingen van HÖRING ¹³¹⁾,

die 54 patienten met typisch asthma bronchiale onderzocht. Hij vond met 2 verschillende antigenen (NEUBERG-KLOPSTOCK en WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN) in 13 gevallen een duidelijk positieve reactie; slechts 2 hiervan hadden vroeger een exsudatieve pleuritis resp. lymphomen gehad, de anderen vertoonden geen tuberculouse afwijkingen. In zijn beschouwingen naar aanleiding van deze interessante bevindingen, noemt hij verschillende, reeds lang bekende feiten: 1e. vele asthmalijders hebben een sterke huidallergie tegenover tuberculine; 2e. desensibiliseering van asthmalijders met tuberculine is vaak mogelijk; 3e. bacterieële toxinen kunnen overgevoeligheidsverschijnselen o.a. asthma veroorzaken. Daar nu bovendien gebleken was, dat vele asthmalijders antilichamen tegen tuberkelbacillenantigenen in hun bloedserum bezitten, wijst hij er nog eens met nadruk op, dat in vele gevallen toch wel verband zal bestaan tusschen tuberculose en asthma. In mijn materiaal heb ik 12 gevallen van asthma bronchiale onderzocht, waarvan slechts één een positieve reactie vertoonde.

Een echte onspecifieke reactie ontmoeten we, indien een luetisch serum van een patient zonder tuberculouse infectie, positief reageert met tuberculose-antigeen. Zooals reeds gezegd is, bleken verreweg de meeste antigenen in dit opzicht te kort te schieten. Men trachtte dit tekort te boven te komen door de verzadigingsproeven vlg. CASTELLANI toe te passen, het serum te verwarmen tot 60° — 62° of volgens het procédé van RENAUX te werk te gaan.

Hoewel deze methoden zeker waardevol zijn, zijn ze toch vrijwel overbodig geworden door het in dit opzicht nagenoeg specifieke antigeen van WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN. Ik onderzocht 27 gevallen met positieve WASSERMANN. Bij 19 gevallen vond ik deze tuberculosereactie negatief, bij 8 gevallen waren de lues- en de tuberculosereacties positief. Bij 2 hiervan was ik in de gelegenheid verzadigingsproeven te verrichten. Het bleek, dat in beide gevallen voor beide aandoeningen antilichamen bestonden. Hierbij kon dus van een onspecificiteit der reactie niet gesproken worden. Bij 4 overige gevallen heb ik helaas deze proeven niet kunnen doen, doch we behoeven niet te besluiten, dat deze 4 allen onspecifieke reacties zijn geweest, integendeel, deze kwamen voor bij uitgesproken tuberculosegevallen, zoodat we m.i. ook hier wel aan mogen nemen, dat er tuberculose-antilichamen bestonden naast een positieve WASSERMANN. We hadden dus, als men de 2 overblijvende reacties als onspecifieke rekent, een percentage onspecifieke tuberculosereacties bij lues van 10%.

WITEBSKY en KLINGENSTEIN geven op eenige honderden syphilissera

een percentage aan van 6—7%. Gezien de groote „gemiddelde fout” kan men niet concludeeren, dat mijn uitkomsten slechter zijn, dan die van WITEBSKY en KLINGENSTEIN. Het oogenschijnlijk groote verschil kan toevallig zijn. Gaan we eens na, wat andere onderzoekers met ditzelfde antigeen konden bereiken, dan vinden we, dat HÄMEL en HORSTER ¹³³⁾ op 20 luessera de W.K. en K. éénmaal positief vonden.

GRAFE ¹³⁴⁾ verklaart zelfs, dat een positieve WASSERMANN de reactie in het geheel niet stoort; volgens KINDERMANN en SCHRAMEK ¹³⁵⁾ reageert een enkele maal een luetisch serum positief, hetgeen echter op de reeds genoemde wijze onderdrukt kan worden door sterkere verwarming.

Tenslotte mag men uit het bestaan van een positieve WASSERMANN nog niet het besluit nemen, dat er lues in het spel is. De reactie van WASSERMANN kan immers positief zijn bij *sterke labiliteit* van het bloedserum, malaria, endocarditis lenta, lepra, roodvonk, rattebeetziekte en vele andere ¹³⁶⁾ en ook bij tuberculose ¹³⁷⁾. In tegenstelling hiermee staat het onderzoek van BERLIN-CERTOV en POLITOVA ¹³⁸⁾, die bij het onderzoek van 534 patiënten met ernstige tuberculeuze afwijkingen verschillende luesreacties uitvoerden (WASSERMANN, KAHN en SACHS-GEORGI) en geen enkele maal een onspecifieke luesreactie konden waarnemen.

Wij moeten er echter toch rekening mee houden, dat het gelijktijdig voorkomen van positieve lues-WASSERMANN en van positieve tuberculosereactie zoowel kan berusten op onspecificiteit der luesreactie als op die der tuberculosereactie, al zijn de verschillende schrijvers het hierover niet eens. De door mij verkregen uitkomsten zijn, hoewel iets minder fraai dan van de andere onderzoekers, toch veel beter dan die, verkregen met de vroegere complementbindingsreacties.

BESREDKA ¹⁰¹⁾ geeft in 1914 reeds zeer beslist aan, dat sera met positieve lues-WASSERMANN sterk de neiging hebben, ook met zijn tuberculose-antigeen te reageeren. Zoo geeft BOUVIER ¹³⁹⁾ op, met het antigeen van BESREDKA het enorme percentage van 66,6% positieve tuberculosereacties bij lues verkregen te hebben (20 van 30 gevallen).

Ook BIJL en VAN DER HOEDEN ¹⁴⁰⁾ vonden, dat $\pm 50\%$ van de patienten met sterk positieve WASSERMANN, een positieve tuberculose-reactie volgens BESREDKA vertoonden.

GERHARTZ ¹⁴¹⁾ komt in een belangwekkend artikel tot het besluit, dat luetische en tuberculeuze reacties in eenzelfde serum verregaand onafhankelijk van elkaar moeten zijn, aangezien bij tuberculose-patienten met sterk positieve tuberculosereactie, de luesreacties alleen

dan positief waren, als ze ook inderdaad lues bleken te hebben. En omgekeerd bleek bij sera met sterk positieve luesreacties slechts 2 maal een positieve tuberculosereactie voor te komen. Als luesreacties voerde hij uit: WASSERMANN, KAHN en SACHS-WITEBSKY, als tuberculosereacties: BESREDKA en een enkele maal MEINICKE of NEUBERG-KLOPSTOCK.

RIEUX ¹⁴²⁾ acht de reactie bij lues zelfs zoo vaak positief, dat ze hierbij niet voor de diagnose gebruikt kan worden.

ISABOLINSKI ¹⁴³⁾ vond op 150 sera van luetici 60-maal ook haemolyse-remming met het tuberculoseantigeen van BESREDKA; SMITH en HEWAT ¹⁴⁴⁾ vonden met hetzelfde antigeen 18 reacties positief bij 68 luetici.

ILSE BUDDE ¹⁴⁵⁾ vond bij 16 luesgevallen steeds de tuberculosereactie met het antigeen van NEUBERG-KLOPSTOCK positief, OBERSTEBERGHUS ¹⁴⁶⁾ vond echter 8 luessera met positieve lues-WASSERMANN negatief met hetzelfde antigeen. KLOPSTOCK ¹⁴⁷⁾ zelf verklaart in 1931, dat met zijn antigeen steeds 10—20% der luetische sera positief reageeren.

LOCHTKEMPER en SCHULTE-TIGGES ¹⁴⁸⁾ onderzochten 115 sera met positieve WASSERMANN met 5 verschillende tuberculose antigenen en vonden 35% positief.

In 1927 geeft MAX PINNER ⁹⁾ in zijn overzicht „Die Serodiagnose der Tuberkulose” aan, dat uit de literatuur uit de cijfers van positieve tuberculosecomplementbindingsreacties bij positieve WASSERMANN een gemiddelde is te berekenen van 29%.

Het antigeen van BOQUET en NÈGRE wordt in dit opzicht al even slecht beoordeeld. De schrijvers zelf ¹⁴⁹⁾ geven aan, dat luessera vaak positief reageeren, doch noemen geen cijfers; CALVO, VICENTE en LAGUNA ⁷⁷⁾ vonden 7 van 8 luesgevallen positief; BEZANÇON en BERGERON ¹⁵⁰⁾ onderzochten 5 luetici met het antigeen van BESREDKA en van BOQUET en NÈGRE: 4 positief.

Het tuberculoseantigeen van WASSERMANN gaf in dit opzicht zeer teleurstellende resultaten: VOS ¹⁵¹⁾ vond 42% der luesgevallen positief, JACOB en MOECKEL ¹⁵²⁾ en vele anderen zijn het er over eens, dat dit antigeen allerminst specifiek is ten opzichte van lues.

BLUMENTHAL ¹⁵³⁾ geeft in zijn publicaties over onderzoekingen met zijn antigeen telkens weer aan, dat luessera positief kunnen reageeren en voert daarom steeds tegelijk de lues-WASSERMANN uit.

LIGNITZ ¹⁵⁴⁾ komt bij het gebruik van het antigeen van BESREDKA tot het besluit, dat positiviteit alleen dan van belang is, als de lues-WASSERMANN negatief is.

Als we dus de uitkomsten van de samenstellers van het antigeen van W. K. en K., die van de andere onderzoekers, en onze eigen resultaten bekijken, is er een groote vooruitgang verkregen.

Tenslotte kan de malaria de tuberculosereactie positief maken. RIEUX en M^{lle} BASS ¹⁵⁵) constateerden dit reeds in 1921; ze vonden op 17 malarialijders 3 positieve complementbindingsreacties (BESREDKA) en RIEUX ¹⁴²) sloot deze patienten dan ook uit van de reactie evenals lueslijders.

Hier moet ook het onderzoek van HEINEMANN ¹⁵⁶) genoemd worden, al onderzocht deze met de complementbindingsreactie met een, naar naderhand gebleken is, ondeugdelijk antigeen (Alttuberkulin „Hoechst”). Hij vond 1e. dat de positieve tuberculosereactie steeds voorbijgaand was, 2e. dat malaria (tropica, tertiana, en chronische malaria) in $\pm 33\%$ positief reageerde.

BARCHI ¹⁵⁷) werkte eveneens met Alttuberkulin als antigeen in de complementbindingsreactie en vond op 30 gevallen van chronische malaria 60% positieve resultaten.

Nog meer factoren, waarvan straks bij de bespreking der casuïstiek voorbeelden zullen worden aangehaald, hebben soms invloed op den uitslag der reactie. Zoo vonden BRANDT en v. AICHBERGEN ⁹⁶) positieve reacties bij zware anaemie en beginnende catarrhale icterus. Zij vermoeden, dat lipoidaemie de oorzaak is.

BESPREKING NAAR AANLEIDING DER METHODEN DER TUBERCULOSEREACTIES.

Agglutinatiereacties.

Zooals reeds besproken is, werden de eerste onderzoekingen naar het voorkomen van antistoffen bij tuberculoselijders verricht met agglutinatiereacties (ARLOING, DUBARD, COURMONT, KOCH). Alleen COURMONT ¹⁵⁸) is nog vele jaren geestdriftig gebleven voor deze reactie, de andere onderzoekers hebben haar laten varen. In 1922 ¹⁵⁹) komt hij bij een vergelijking van deze reactie met de methode der complementbinding tot het resultaat, dat de agglutinatiereactie beter en gemakkelijker is.

FORNET ²⁴) publiceerde in 1921 een agglutinatiereactie met een op bijzondere wijze bereid antigeen en toonde zich tevreden met de resultaten. Hij vond een enthousiast navolger in KOHLER ¹⁶¹), die weliswaar constateerde, dat maligne tumoren, ziekte van Hodgkin, actinomycose enz. ook vaak sterk positief reageerden, doch desondanks

het „diagnosticum” zeer hoog schatte, en in GITTNER ¹⁶²⁾, die zelfs beweerde, dat het „diagnosticum” van FORNET een zeker middel was om een tuberculeuze aandoening vast te stellen. Latere onderzoeken hebben echter de geringe waarde voor het tuberculose-onderzoek bewezen. (Zie PINNER, *Die Serodiagnose der Tuberkulose* 1927).

SPRONCK en HAMBURGER ¹⁶³⁾ hebben uit tuberkelbacillencultures door maandenlang voortkweeken op vloeibare voedingsbodems, waarvan het gehalte aan pepton en glycerine voortdurend verminderd en tenslotte geëlimineerd werd, een gramnegatieven, niet-zuurvasten bacillenvorm geïsoleerd. Deze stam hebben de schr. voor de agglutinatieproef aangegeven onder den naam van „Transmutan-diagnosticum”.

SCHULTE-TIGGES ¹⁶⁴⁾ heeft de reactie bij 71 gevallen nagegaan. De specificiteit is echter niet groot, daar ook longtumoren, latente pneumonieën en lues positieve reacties geven. ALLARD en WOTZKA ¹⁶⁵⁾ waren weinig geestdriftig over de bereikte resultaten. Deze reactie is dus weinig bruikbaar, ondanks het feit, dat aan een der eerste voorwaarden voor de bereiding van een werkzaam antigeen — de verwijdering van den wasmantel — is voldaan.

Praecipitatiereacties.

Enkele praecipitatiereacties zijn nog in gebruik, waarbij eerst genoemd moet worden die van SCHLOSZBERGER ¹⁶⁶⁾, uitgevoerd met een antiformine-extract uit tuberkelbacillen en een lecithineoplossing. MECKLENBURG en DAU ¹⁶⁷⁾ verrichtten de reactie bij 437 patiënten. Zij schrijven er slechts geringe waarde aan toe, voornamelijk van prognostischen aard. Specifiek is de reactie in geen deele, daar een groot deel van 35 gezonden positief reageerde. Het lijkt dus meer op een labiliteitsreactie, dan op een specifieke praecipitatiereactie. Tot een gelijkkluidende conclusie kwam SCHULTE-TIGGES ¹⁶⁸⁾ naar aanleiding van een onderzoek en vergelijking met complementbindingsreacties bij 300 gevallen van tuberculose. SCHROEDER ¹⁶⁹⁾ laat zich er gunstig over uit en vindt haar gelijkwaardig aan de complement-bindingsreactie van W. K. en K.

Dan wordt nog wel gebruikt een praecipitatiereactie volgens LEHMANN-FACIUS en LOESCHKE ¹⁷⁰⁾. Het gebruikte antigeen is een waterig extract uit verkaasde lymphklieren van mensch en rund, waarvan bepaalde eiwitfracties als antigeen gebruikt worden. Deze reactie was in het algemeen positief bij lichte, negatief bij zware gevallen. Daar vermoed werd, dat dit een gevolg was van een teveel aan antigeen bij de zware gevallen, trachtte LEHMANN-FACIUS dit als volgt te bewijzen door omkeering der proeven: met behulp van een

zeer sterk antilichamen-houdend serum kreeg hij een positieve troebelingsreactie met anders negatief reagerende, doch sterk antigeenhoudende sera. Hij toonde dus i.p.v. antilichamen, het antigeen aan. STEINERT ¹⁷¹⁾ slaagde er op deze wijze in 83% van alle tuberculosegevallen positief te vinden en bij de onderscheiding van actieve en inactieve tuberculose vond hij slechts 12,6% onjuiste resultaten. In 1933 beschrijft LEHMAN-FACIUS ¹⁷²⁾ een nog betere methodiek met dezelfde reactie, door een gemakkelijker aflezing der resultaten te bewerkstelligen. HORSTER ¹⁷³⁾ laat zich waardeerend over de reactie uit, op deze wijze uitgevoerd. Hij vond bij actieve longtuberculose ongeveer 70% positief, 200 contrôlesera allen negatief.

Na de ontdekking der phosphatidefracties der tuberkelbacillen door ANDERSON, leek het verlokkelijk, deze te gebruiken voor diagnostische doeleinden.

DOAN ¹⁷⁴⁾ beschrijft zijn onderzoek bij 134 patiënten:

- 1e. met phosphatide als antigeen.
- 2e. met een serum van een konijn, dat geïmmuniseerd is tegen phosphatiden. Deze laatste onderzoekingsmethode zou de gevoeligste reactie zijn in vroege gevallen en als het lichaam niet op de bacillen reageert.

Zijn conclusie luidt, dat een titer van het serum van 1:160—1:320 antigeenverdunding of 1:20—1:40 serumverdunding een actief proces waarschijnlijk maakt. De sera van tuberculeuze kinderen reageren allen sterk positief, een opvallend verschijnsel, daar bij kinderen de ontwikkeling van antilichamen gebrekkig is.

DOAN en MOORE ¹⁷⁵⁾ voerden praecipitatiereacties met het z.g.n. phosphatide A³ en vonden daarmee bij kinderen, die met B.C.G. geënt waren, vanaf een tijdstip van 3 weken na de enting, een sterke toeneming van den titer. Bovendien konden ze met antilichamen-houdend konijnensersum het phosphatide in lichaamsvloeistoffen van tuberculeuze dieren en personen met progressieve tuberculose aantoonen. Leken deze resultaten hoopgevend op een wellicht zeer specifieke reactie, later kwamen anderen tot tegenovergestelde conclusies:

DUNCAN e.a. ¹⁷⁶⁾ stelden vast, dat ze bij konijnen door injectie van phosphatiden van humane tuberkelbacillen geen of nauwelijks antilichamen konden opwekken, en bovendien, dat dit phosphatide in het geheel niet reageerde met sera van 13 patienten met open longtuberculose. Dit is dus wel een geheel ander geluid en ze komen tot de teleurstellende conclusie, dat de door DOAN en ook door PINNER beschreven reacties veroorzaakt moeten zijn door een bijkomstige

stof, die spoedig verdwijnt bij verouderen der cultures. Het lijkt dus wel bijna zeker, dat de hoop, gesteld op de specifieke bestanddeelen der tuberkelbacillen, ijdel zal blijken te zijn.

In de laatste jaren is sterk opgekomen een praecipitatiereactie van MEINICKE ¹⁷⁷), die hij uitvoert naar de wijze der reactie van MEINICKE op lues. Hij gebruikt 3 verschillende antigenen:

1. een alcoholisch tuberkelbacillen-antigeen, dat zeer krachtig is,
2. een alcoholisch tuberkelbacillen-antigeen, dat minder krachtig is,
3. een waterig tuberkelbacillen-antigeen,
4. een alcoholisch antigeen als contrôle, het origineele standaard extract voor de M.K.R. II.

Hij leest dan op 3 verschillende wijzen af, als microscopische reactie, volgens de centrifugeermethode en als „Kuppenreaktion” *).

*) In een uitvoerig artikel beschrijft hij in 1934 de methodiek:

I. Microreactie:

Bij 0.2 cc. serum wordt 0.5 cc. van 4 antigeenverduunningen gevoegd. Daarna wordt uit ieder buisje een druppel vloeistof genomen en op een objectglas gebracht. Het objectglas komt in een „vochtige kamer” bij 20° gedurende 2 à 3 uur, de reacties worden dan bij 60-voudige vergrooting afgelezen. Bij negatieve reacties is het gezichtsveld gelijkmatig gekorrelt, bij positieve reacties worden dikkere vlokken en schollen gevormd.

II. Centrifugeermethode.

Alle voorschriften voor de microreactie gelden ook hier. Men centrifugeert eenvoudig na het afnemen van een druppel van het mengsel uit de buisjes, deze 10 min. lang bij 2000—2500 omwentelingen. Er ontstaat dan een blauw, vlak, knopvormig sediment. De bovenstaande vloeistof wordt afgegoten en de buisjes met het sediment *naar boven* in het statief geplaatst. Na 10 min. bekijkt men het gedrag van het sediment, nl. of het geheel of gedeeltelijk langs den wand van het buisje naar beneden gelopen is, of dat de wand van het buisje er helder en doorzichtig uitziet. Bovendien bekijkt men de sedimenten van boven en ziet of ze klein en scherp begrensd gebleven zijn, dan wel zich iets verbreed hebben of zonder scherpe begrenzing in de omgeving overgelopen zijn. Als het sediment klein en scherp begrensd op zijn plaats is gebleven, heet de reactie sterk positief.

III. „Kuppenreactie”.

Bij uitvoering der microreactie behoeft men geen aparte maatregelen meer te nemen. Men laat eenvoudig de buisjes bij kamertemperatuur tot den volgenden dag staan op statieven met doorboord voetstuk, zoodat men den bodem van het buisje van onderen goed kan zien. Men leest af, welken vorm en kleur de sedimenten hebben. Bij negatieve reactie ziet men in het midden van den bodem een klein, blauw, knopvormig sediment, dat bij scheefhouden van het statief in een smalle, blauwe streep uitloopt. Bij positieve reactie is de heele bodem bedekt door een breed, kruimelig, wit-blauwachtig sediment, dat ook bij langdurigen scheeven stand niet uitloopt.

De uitkomsten met deze reactie schijnen zeer goed te zijn. MÜLLER en SCHEDTLER ¹⁷⁸⁾ achten de uitkomsten van deze reactie bij longtuberculose iets beter dan de reactie volgens WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN, in het verloop der tuberculose vertoonde de MEINICKE-reactie echter veel grootere schommelingen, was dus veel minder constant positief, wat m.i. een nadeel dezer reactie is. Bij hun contrôlegevallen (107) bleek de MEINICKE meer positieve uitslagen te geven, dus minder specifiek te zijn. Over de onderzochte luessera wordt niet verder gesproken.

DISSMANN en DISSMANN-WOSAK ¹⁷⁹⁾ onderzochten 1200 sera met 139 contrôlegevallen. Deze schrijvers meenen de reactie van MEINICKE iets belangrijker te vinden, vinden echter meer onspecifieke reacties.

De recente onderzoekingen van HEYMER en SCHULTE-TIGGES ¹⁸⁰⁾ geven een eenigszins anderen indruk. Zij onderzochten 414 patienten met verschillende reacties: met de complementbindingsreacties volgens W. K. en K. en volgens BESREDKA, met de reactie van MEINICKE op 5 verschillende wijzen, met de reactie van HAAG, de WITEBSKY-BALLUNG-reactie en met het antigeen van LEHMANN-FACIUS. Zij vonden bij actieve tuberculose de meeste positieve reacties met de complementbinding volgens BESREDKA en met de MEINICKE „Kuppenreaktion”. Bij de contrôlegevallen bleek de reactie van BESREDKA vrij wat betere resultaten te geven dan die volgens W. K. en K.. De MEINICKE „Kuppenreaktion” was nog beter, indien afgelezen na 24 uur en niet na 48 uur.

BÖHNE ¹⁸¹⁾, die het enorme aantal van 20.000 patienten met deze reactie heeft onderzocht, waarbij 2110 tuberculosepatienten, vond bij 96% der lijders aan uitgebreide, actieve, caverneuze longtuberculose een sterk positieve reactie. Stationnaire of genezende gevallen reageerden zwak positief of negatief. 1.4% der contrôlegevallen (8101) gaven een positieve reactie. Vooral voor den röntgenoloog is deze tuberculosereactie in een groot aantal gevallen van belang geweest voor de differentieëring van mediastinaaltumoren, bronchopneumoniën enz. Merkwaardigerwijs wordt in het geheele artikel niet gesproken over den uitslag der reactie bij lues, merkwaardig vooral omdat ZEYLAND en PIASECKA-ZEYLAND ¹⁸²⁾ aangeven, dat ze bij lues sterk positieve reacties vonden. Deze schrijvers kunnen ook verder de reactie niet zeer hoogschatten, daar ze bij aflezing na 24 uur 80% der tuberculoselijders positief vonden, echter ook 33% der gezonden!

DAHR en SCHEER ¹⁸³⁾ konden bij patienten met gelijktijdig voorkomen van lues en tuberculose met de door MEINICKE aangegeven absorptiemethode zelden of nooit de luetische reactielichamen uitschakelen.

In 1937 geeft ZINK¹⁸⁴⁾ in een overzichtsreferaat als zijn meening te kennen, dat bij het serologische tuberculoseonderzoek de complementbindingsreacties het betrouwbaarst zijn, vooral die volgens BESREDKA en volgens W. K. en K. Hij meent, dat we sedert 1914 nog weinig verder zijn en dat we op de tot nu toe gevolgde wijze van onderzoek — het aantoonen van een overschot van antilichamen —, nooit een betrouwbare laboratoriumreactie op tuberculose zullen vinden.

Volgens KALK en BURGMANN¹⁸⁵⁾ leveren diabetici in een groot percentage positieve reacties, hoewel BÖHNE¹⁸¹⁾ dit weer niet vond. TRAUTWEIN¹⁸⁶⁾ vond zelfs onspecifieke positieve reacties bij typhus, BÖHNE vond dit nooit.

Deze uiteenlopende resultaten geven te denken; het lijkt waarschijnlijk, dat vele onderzoekers de reactie te spoedig positief rekenen.

SPIES¹⁸⁷⁾ komt op een overigens te klein aantal (66) tuberculosegevallen tot het resultaat, dat 53% positief reageert. Hij vergelijkt de MEINICKE-reactie met de reactie vlg. HAAG en NIGGEMEYER¹⁸⁸⁾, die hij bij dezelfde patienten in 75.8% positief vond.

Labiliteitsreacties¹⁸⁹⁾.

Deze kan ik zeer in het kort afhandelen, aangezien de meest gebruikte, de bepaling van de bezinkingssnelheid der erythrocyten volgens WESTERGREN of LINZENMEYER overbekend is.

De reactie van VERNES wordt uitgevoerd met actief versch serum, vermengd met 1.25% resorcine-oplossing. Uit het troebelingsverschil na aflezing, direct en na 4 uur, wordt photometrisch het resultaat verkregen. NÈGRE¹⁹⁰⁾ laat zich als volgt uit: „bij de zich ontwikkelende longtuberculose gevoeliger dan de complementbindingsreactie, bij de inactieve vormen omgekeerd. Dus een echte „labiliteitsreactie”. BAYLIS¹⁹¹⁾ acht de reactie van waarde als activiteitsdiagnosticum en als gids bij de behandeling.

De reactie van MATÉFY¹⁹²⁾ wordt uitgevoerd met een $\frac{1}{2}$ ‰ oplossing, van aluminiumsulfaat (als uitvlokingsreactie).

COSTA¹⁹³⁾ gebruikt 1.5 cc. 2% novocaine-oplossing met 3 druppels 5% natriumcitraat. Daaraan 3 druppels bloed toegevoegd en na centrifugeeren 1 dr. geconcentreerde formaline; na 1—8 minuten ontstaat in positieve gevallen een wolkachtige uitvlokking.

DARANYI¹⁹⁴⁾ behandelt het actieve serum met alcohol, verdund met 2% Na.Cl-oplossing, dan in waterbad bij 62°, na korten tijd uitvlokking in positieve gevallen.

Al deze labiliteitsreacties worden veel toegepast, voornamelijk die

van WESTERGREN en LINZENMEYER. Deze reacties zijn ongetwijfeld van groote waarde, doch mogen niet als specifiek beschouwd worden.

Nog één reactie moet genoemd worden, die op geheel andere principes berust, en die misschien waardevol zou kunnen zijn. Dit is het onderzoek naar de coagulatie van het tuberculeuze serum, naar den z.g.n. „coagulatieband”: in 1930 heeft WELTMANN¹⁹⁵⁾ zijn eerste waarnemingen hierover gepubliceerd. De reactie wordt als volgt verricht: men maakt een reeks verdunningen van een 10% oplossing van calcium-chloride in kolfjes: 0.1—0.2—0.3—0.35—0.4—0.5—0.6—0.7—0.8—0.9—1.0, dan bijvullen met aq. dest. tot 100 cc. en gebruikt hiervan telkens 5 cc. in 11 verschillende buisjes, dan wordt bij alle buisjes 0.1 cc. serum gevoegd. Vervolgens wordt alles in een kokend waterbad gezet gedurende 15 min. Normaliter reikt de coagulatie tot het 6e buisje, doch dit kan binnen bepaalde grenzen varieeren. In pathologische omstandigheden kan de coagulatieband versmald of verbreed worden. In 1931 publiceeren WELTMANN en PAULA¹⁹⁶⁾ hun onderzoekingen bij talrijke vormen van tuberculose en komen tot de volgende uitspraken: de coagulatie schijnt vóór alles te weerspiegelen, wat er in de weefsels gebeurt n.l. exsudatie en (of) bindweefselvorming. Heeft er voornamelijk exsudatie plaats (zooals bij de croupeuze pneumonie, acute polyarthritis, pleuritis exsudativa, is nagegaan), dan wordt de C.(oagulatie) B.(and) verkort, zoo ook bij zuiver exsudatieve tuberculeuze processen. Aan den anderen kant veroorzaken induratieve processen een verlenging van den C.B. zooals dit vrij zuiver is te constateeren bij de indureerende pneumonie, cirrhosis hepatis en chronische arthritis. Aangezien nu bij de tuberculose wel steeds exsudatieve en induratieve processen naast elkaar optreden, neemt de C.B. een zekere „compromis-plaats” in en komen er door het antagonisme van exsudatieve en indureerende processen typen van C.B. tot stand, die op zich zelf niet karakteristiek zijn, doch in verband met vroeger gevonden C.B.en een inzicht kunnen verleenen in het verloop van het proces. Diagnostische waarde is er dus m.i. alleen in extreme gevallen aan te hechten. Vindt men een normalen C.B., dan kan men er alleen op den duur iets aan hebben, m.i. komt men dan precies even goed met eenvoudiger reacties uit, bv. de bloedbezinkings-snelheid der erythrocyten. Immers bij actieve processen kan de C.B. normaal zijn, terwijl de bezinking door haar verhooging op activiteit wijst. Ik ben op deze reactie iets uitvoeriger ingegaan, daar ze tegenwoordig vrij veel toegepast wordt. In recente publicaties wordt de waarde dezer reactie echter hooger aangeslagen¹⁹⁷⁾.

Complementbindingsreacties.

Voor deze reacties zijn noodig: antigeen, complement en het te onderzoeken serum. De bereiding der verschillende antigenen werd reeds eerder besproken. Er komen bij de uitvoering dezer reacties, en dus ook bij de toepassing van de door mij gebruikte reactie van W.K. en K., allerlei meer of minder belangrijke technische bijzonderheden voor, die een bespreking noodig maken.

Complement: Wanneer bij de antigeen-antilichamen-reactie het toegevoegde complement gebonden wordt, kan er geen haemolyse optreden van de later toegevoegde, gesensibiliseerde schapenbloed-lichaampjes. Heeft men teveel complement toegevoegd, dan blijft er complement over en treedt toch haemolyse op. Men moet dus liefst werken met een dergelijke hoeveelheid complement, dat er niets over kan blijven bij positieve reactie. Het serum en het antigeen binden echter ook reeds complement (anticomplementaire werking). Het is volgens sommigen noodig het complement te titreeren. Een te fijne instelling in dit opzicht geeft echter meer kans op het vinden van positieve resultaten bij toevallige eigenschappen van het bloedserum, die in deze richting werken. PESCH¹⁹⁸⁾ is in dit opzicht optimistisch gestemd door de uitkomsten van zijn onderzoekingen. Hij probeert de reactie volgens KLOPSTOCK-NEUBERG te verbeteren door het complement te titreeren, bij 4° de reactie te verrichten i.p.v. bij 37°, binding gedurende 4—6 uur, verwijdering van eigen haemolysinen door binding aan schapenerythrocyten, gebruik van toenemende hoeveelheden patiëntens serum, en krijgt daardoor 20% meer positieve resultaten en niet meer onspecifieke reacties dan tevoren.

Inactivering. Het te onderzoeken serum wordt bij practisch alle tuberculose reacties tevoren geïnactiveerd om twee redenen:

1e. men vernietigt het eigen complement van het serum en kan dan een bekende hoeveelheid complement toevoegen.

2e. de labiliteit van het serum wordt er door verminderd.

Serumverduunning. Het te onderzoeken serum wordt verdund met physiologische zoutoplossing, om een z.g.n. „Überschuszhemmung” te ontgaan. Het is immers bekend, hoewel paradoxaal klinkend, dat verdund serum vaker positieve reacties geeft, dan onverdund. Vermoedelijk is een vermindering van den invloed der labiliteit van het serum hierbij het belangrijkste.

Amboceptor. De voor de complementbindingsreactie noodige amboceptor, tegenwoordig in zeer sterke concentratie in den handel, wordt in een bepaalde, voor de verschillende reacties vastgestelde, concentratie toegevoegd. Het is duidelijk, dat men hierdoor de kans loopt, eenerzijds

eens een zwak positieve reactie mis te loopen door een snel en sterk haemolyseerend werkenden amboceptor, anderzijds door een zwakker werkenden amboceptor een sterke in plaats van een zwakke reactie af te lezen.

In plaats van met een toegevoegden amboceptor werkten b.v. LEUCHTENBERGER en LORENZ¹⁹⁹⁾ met de eigen haemolysinen van het te onderzoeken serum tegen schapenbloedlichamen, dus met behulp van den eigen amboceptor *). Een groot bezwaar voor de practische toepassing is, dat voor de reactie van ieder serum de amboceptor uitgetitreerd moet worden. WILLI DEWENTER²⁰⁰⁾ uit de kliniek van EPPINGER gebruikte deze reactie met het antigeen van BESREDKA en W. K. en K. en vond uitstekende uitkomsten.

[PESCH deed dus juist het omgekeerde en verwijderde de eigen haemolysinen door ze te voren te binden aan schapenbloedlichamen en verkreeg op deze wijze zeer goede uitkomsten.]

GOLDENBERG²⁰¹⁾ wil uit de hoeveelheid aanwezige eigen amboceptor en eigen complement de diagnose stellen. Hij staat op het standpunt, dat de tuberkelbacilleninfectie een vermeerdering der schapenbloedhaemolysinen tengevolge heeft (evenals we dit b.v. weten voor de mononucleosis infectiosa). De tuberkelbacil zou dan dus als een heterogenetisch antigeen werken, dus als een „antigeen van FORSSMANN”¹¹⁵⁾. Zooals reeds gezegd is, vond OSUMI¹¹⁶⁾ in tuberkelbacillen echter geen heterogenetisch antigeen. Volgens WITEBSKY en KLINGENSTEIN kan

*) *Methodiek*: 1. voorproef voor bepaling van de hoeveelheid amboceptor tegen schapebloedlichamen:

Het 1 : 10 verdunde serum (met steriele physiol. zoutopl.) wordt in stijgende hoeveelheden 0.1—1.0—1.5 cc. in buisjes gedaan, in een 4e buisje 0.2 cc. onverdund serum. Daarna worden alle sera tot 1.5 cc. met phys. zout aangevuld. In ieder buisje komen 0.5 cc. van de 5% schapebloed-suspensie en 0.5 cc. 1:10 verdund versch caviaserum; schudden en een $\frac{1}{2}$ uur bij 37°. Als amboceptorhoeveelheid geldt dan de waarde, waarbij nog complete haemolyse optreedt. Deze hoeveelheid serum, die onder de genoemde voorwaarden nog een volkomen haemolyse bewerkt, wordt in de aansluitende complementbindingsproef gebruikt.

2. *Hoofdproef*: Complementbindingsreactie met tuberculoseantigenen. De in de voorproef gevonden hoeveelheid serum wordt in 10 buisjes gepipetteerd. In deze buisjes komt dan verder het antigeen en complement. Na schudden 1 uur bij 37°, daarna overal toevoeging van 0.5 cc. 5% schapebloedlichamen-suspensie.

3. *Aflesen der reactie*: De afloop der reactie met Besredka-antigeen geeft den doorslag voor de beoordeling van positieve of negatieve reactie. De schrijvers rekenen een zwak positieve reactie tot de positieve en hebben geen rubriek: twijfelachtige gevallen. Zoo zijn misschien hun uiterst gunstige uitkomsten te verklaren: 100% positieve reacties bij klinisch vaststaande tuberculose.

de vermeerdering dezer haemolysinen daardoor verklaard worden, dat evenals bij iedere infectieziekte de antilichamenfunctie door de verhoogde labiliteit van het bloedserum, versterkt wordt. De reactie vlg. GOLDENBERG is dan dus meer een reactie, berustend op labiliteit, dan op specificiteit.

SCHULTE-TIGGES ²⁰²⁾ toont zich met deze reactie nogal ingenomen, doch vindt haar iets minder gunstig dan de origineele methode van BESREDKA.

Antigeenverduunning. Het is nog niet verklaard, waarom het ééne serum een positieve reactie kan geven bij sterkere verduunning, het andere bij zwakkere verduunning van het antigeen. Dit is echter een feit en bovendien krijgt men bij het toepassen van een toenemende reeks verduunningen een indruk over de sterkte der reactie.

Temperatuur. De optimale temperatuur voor deze reacties is 37°. De binding antigeen-antilichaam schijnt bij de tuberculose langzamer te verlopen dan bij andere aandoeningen; daarom zijn alle schrijvers het er over eens, dat men de binding minstens één uur moet laten duren.

Sommigen voeren dit gedeelte der reacties uit bij ijskasttemperatuur en gedurende langeren tijd (PESCH), anderen laten de binding bij 37° 1½ uur duren, daarna nog 1 uur in kamertemperatuur. Een onderzoeker als PINNER ⁹⁾ zegt, geen voordeel in de z.g.n. „koude binding” d.i. bij kamertemperatuur te kunnen vinden.

BLUMENTHAL, WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN laten 1½ uur bij 37° binden.

Dezentijd kan men niet ad libitum verlengen, aangezien het verdunde complement, vooral bij een temperatuur van 37°, vrij snel in sterkte kan terugloopen.

Wijze van aflezen der resultaten: Hierin schuilt waarschijnlijk een belangrijke oorzaak voor de zeer groote verschillen in uitkomsten van verschillende onderzoekers met dezelfde reacties. Natuurlijk is vergelijking van verschillende statistieken, die over geheel verschillende individuen handelen, waarvan de waardeering van den graad der aandoening reeds een uiterst belangrijk punt uitmaakt, buitengewoon lastig, doch een feit is het, dat men het aantal positieve reacties sterk op kan voeren, als men ook de zwakke als positieve rekent. Dit nu is in vele publicaties gedaan. Dit is vooral verleidelijk, als men slechts tuberculosepatienten onderzoekt en dus een zoo groot mogelijke gevoeligheid tracht te bereiken, zonder dat men geremd wordt door de contrôlegevallen, die wijzen op de zoo ontstaande geringe specificiteit.

RESULTATEN MET COMPLEMENTBINDINGSREACTIES BIJ DE TUBERCULOSE BEREIKT.

In 1922 heeft PFANNENSTIEL ²⁰³⁾ een statistiek opgesteld over de resultaten van alle complementbindingsreacties tot 1922 en komt tot de volgende cijfers: samen 20.000 gevallen onderzocht:

	positief in %	negatief in %
gezonden	5	95
verdacht op tbc	50	50
beginnende longtbc	70	30
matig voortgeschreden longtbc	77	23
ver voortgeschreden longtbc	75	25
andere ziekten	10	90
lues	20	80

Wanneer we de resultaten met de verschillende reacties afzonderlijk bespreken, komen we tot het volgende overzicht:

A. Met de reactie van *Besredka*.

Het aantal onderzoeken met het antigeen van BESREDKA is zeer groot geweest en de uitkomsten waren zeer goed, er was slechts één gebrek aan verbonden: de te geringe specificiteit vooral tegenover lues. BESREDKA ²⁰⁴⁾ zelf berichtte met MANOUKHINE in 1914 over de eerste resultaten. 750 sera werden onderzocht: 85 meer of minder sterk positief, 665 negatief. Bij 69 met sterk positieve reactie werden symptomen van tuberculose, of verdenking op tuberculose vastgesteld. WASSERMANN-positieve luetische sera reageerden vaak positief. Van de 665 met negatieve reactie zijn later 145 klinisch onderzocht, 15 bleken afwijkingen te hebben, die verdacht waren voor tuberculose! Uitsluitsel over de waarde dezer reactie geven deze resultaten dus nog niet. Verder werden nog 150 personen onderzocht, 107 met tuberculose: allen meer of minder sterk positief; 45 zonder tuberculose: allen negatief.

FRIED ²⁰⁵⁾ onderzocht 1199 patiënten en boekte merkwaardig fraaie resultaten: van 400 patiënten met actieve longtuberculose uit een tuberculose-sanatorium reageerde 89.75% positief, van 609 patiënten, die klinisch geen tuberculose hadden, slechts 11 positief. 51 luetici met sterk positieve lues-WASSERMANN: 6 positief.

Deze resultaten beschouwende, zou men met recht kunnen zeggen, dat ze uitstekend zijn en weinig te wenschen over laten. Wel is het

eigenaardig, dat het percentage positief reageerende gevallen bij beginnende, ernstige en zeer ernstige vormen van tuberculose ongeveer gelijk was!

HANSEN en WÜRTZEN ²⁰⁶⁾ vonden bij 340 gevallen van actieve longtbc.:

106	stadium I.	(Turban)	37.9%	positief.
49	„	II.	71 %	„
185	„	III.	84.4%	„

Ze onderzochten veel te weinig contrôlegevallen (29, waarvan 4 positief).

WATANABE ²⁰⁷⁾ verkreeg op 1097 gevallen van longtuberculose 84% positieve resultaten, bij lues 40%, bij contrôlegevallen 26%.

BROUGHTON-ALCOCK, DOUGLAS en LUCEY ²⁰⁸⁾ onderzochten in het geheel 6000 gevallen, bij de patienten met positief sputum vonden ze 84.5% sterk positief, 6.1% zwak positief. Het gemiddelde aantal onspecifieke reacties schommelde tusschen 10 en 20%.

SCHULTE-TIGGES ²⁰⁷⁾ behandelt de na 1922 opgedane ervaringen en heeft zelf 800 patienten onderzocht. Bij zware longtuberculose: 90% positieve reacties, bij gezonden 10% positieve, doch zwakke reacties.

Bijna ontelbaar is het aantal publicaties over onderzoekingen met deze reactie. Vele heb ik uit referaten in het Zentralbl. f. d. gesamte Tuberkuloseforschung bestudeerd, vele persoonlijk gelezen. Het heeft weinig zin, deze hier allen te noemen. Een *gunstig* oordeel spreken uit o.a.: ARMAND DELILLE e.a. ²⁰⁹⁾, BELOT ²¹⁰⁾, BERNARD e.a. ²¹¹⁾, BRONFENBRENNER ²¹²⁾, BOUVIER ¹³⁹⁾, GODUNOWA ²¹³⁾, ICHOK ²¹⁴⁾, KWASNIEWSKI u CIRIC ²¹⁵⁾, RABINOWITCH-KEMPNER ²¹⁶⁾, STAMM ²¹⁷⁾, RIST en AMEUILLE ²¹⁸⁾, LANZENBERG en JAQUOT ²¹⁹⁾, GRUMBACH ²²⁰⁾.

Een *ongunstig* oordeel: ARLOING en LANGERON ²²¹⁾, GINZBURG ²²²⁾, GUTH ²²³⁾, MORELLE en BESSEMANS ²²⁴⁾, VACCAREZZA ²²⁵⁾, RIEUX en BASS ¹⁵⁵⁾, BEZANÇON en BERGERON ¹⁵⁰⁾, en LIGNITZ ¹⁵⁴⁾. Hierbij heb ik niet genoemd de onderzoekers, die met gewijzigde methoden werkten.

B. Met de reactie van *Boquet en Nègre*.

De schrijvers zelf verkregen hiermee in 95% der tuberculosegevallen een positief resultaat ¹⁴⁹⁾, ICHOK ²²⁶⁾ bij zware gevallen 81%, bij lichte tuberculose iets minder. BEZANÇON en BERGERON ¹⁵⁰⁾ vonden dit antigeen beter dan dat van BESREDKA, ook MORALES VILLAZON ²²⁷⁾.

ARMAND-DELILLE c.s. ²⁰⁹⁾ vonden het er aan gelijk, evenals GINSBURG en SCHUWALOW ²²¹⁾.

CALVO, VICENTE en LAGUNA ⁷⁷⁾ vonden het zeer gevoelig, doch ook voor luetische sera! RORDORF ²²⁹⁾ heeft slechte resultaten.

C. Met de reactie van Wassermann.

Hoewel de reactie met het antigeen van WASSERMANN practisch niet meer toegepast wordt, wil ik toch nog eenige resultaten vermelden, die duidelijk maken, dat men dit antigeen terecht verlaten heeft. Dit is o.a. het gevolg van het reageeren met luetische sera, zooals ik reeds even aangeroerd heb.

In 1923 liet JANSSEN ²³⁰⁾ door WASSERMANN zelf 73 sera onderzoeken, en kwam tot de conclusie, dat de reactie streng specifiek was! Ook KLOPSTOCK ⁷³⁾ is van dezelfde meening.

In 1924 is men reeds minder geestdriftig. MYLIUS ²³¹⁾ vond bij 60 tuberculoselijders slechts 20 positief, en ook bij 5 pasgeborenen zonder tuberculose één positieve reactie. JACOB en MOECKEL ¹⁵²⁾ vonden bij zware longtuberculose 40% positief. LANGE en HEUER ²³²⁾ noemen een positieve reactie specifiek voor tuberculose, doch wijzen er ook op, dat men in verschillende laboratoria met dezelfde sera en hetzelfde antigeen nogal eens verschillende resultaten kreeg. SCHLOSZBERGER e.a. ²³³⁾ vonden 29% der contrôlesera ook positief, evenals de luessera. Onderscheiding tusschen actieve en niet-actieve tuberculose is in ieder geval onmogelijk. Ook HÖLAND ²³⁴⁾ laat zich niet waardeerend uit.

Daarna begint men steeds meer in te zien, dat de reactie weinig belangstelling verdient. PINNER ²³⁵⁾ is niet geheel ontevreden, al vindt hij 20% onspecifieke reacties bij gezonden. ROCHAT ²³⁶⁾ zegt over zijn onderzoekingen naar de beteekenis dezer reactie voor de oogheekunde: „Onze indruk is, dat een negatieve reactie niets bewijst, maar dat een positieve wel heel sterk voor tuberculose pleit”. POLAK ²³⁷⁾ drukt zich aan het einde van zijn proefschrift, dat „de tuberculose als aetiologie van chronische uveitis” behandelt en waarin hij de WASSERMANN-reactie als diagnostisch hulpmiddel heeft gebruikt, op dezelfde wijze uit. HERMAN VOS ²³⁸⁾ laat zich afwijzend uit, wat betreft de diagnostische en prognostische beteekenis der reactie. Hij vond 22% der gevallen met actieve tuberculose negatief, bij luetici in 42% positieve reacties. Hij concludeert, dat alleen een zeer sterk positieve reactie diagnostische waarde kan hebben, en dan nog alleen, als men lues uitsluit en de patient tevoren geen tuberculine-injecties heeft gehad. Voor de beoordeeling der prognose acht hij de reactie waardeeloos. SCHULTE-TIGGES ²³⁹⁾ geeft in een overzichtsreferaat in 1926 ook aan, dat de specificiteit, vooral ten opzichte van lues, veel te

wensen overlaat. PFANNENSTIEL ²⁴⁰⁾ is van oordeel, dat deze reactie waarschijnlijk alleen een labiliteitsreactie is.

De opkomst van andere, betere tuberculose-antigenen heeft daarna het antigeen van WASSERMANN op den achtergrond gebracht. In 1927 heeft PINNER ⁹⁾ nog eens aangetoond, waarom de bereiding van dit antigeen wel een mislukking moest worden, hetgeen reeds eerder besproken is.

In 1933 is desalniettemin door een Japanschen onderzoeker SASAKI ²⁴¹⁾ van deze reactie gebruik gemaakt voor een onderzoek naar het tijdstip van het optreden van antilichamen na infectie en van de veranderingen, die in het beloop der ziekte in de reactie op kunnen treden.

D. Met de reactie van Blumenthal ²⁴²⁾.

Deze gebruikte polyvalente antigenen van minstens 6 humane en bovine stammen. De uitkomsten waren ongeveer gelijk aan de gelijktijdig met het antigeen vlg. BESREDKA uitgevoerde reacties, alleen was de specificiteit ten opzichte van de lues grooter. In 1931 beschrijft BLUMENTHAL ²⁴³⁾ de resultaten bij 2000 tuberculosepatienten, in 1932 bij 2500 patienten. Bij de longtuberculose vindt hij, dat bijna 10% der vroeginfiltraten positief reageeren en de exsudatieve vormen in het algemeen in 91%. Hij vond over het algemeen gelijkwaardige uitkomsten met de antigenen van NEUBERG en KLOPSTOCK, WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN en dat van hemzelf, rekent echter ook dan een geval nog positief, als er reeds een spoor haemolyse is opgetreden.

E. Met de reactie van Neuberg en Klopstock.

Tegelijk met de eerste beschrijving van hun antigeen in 1926, deelen de schrijvers ⁸¹⁾ proefnemingen mee bij 200 tuberculosepatienten. De uitkomsten waren niet beter dan die met andere antigenen, het nieuwe antigeen was echter veel gemakkelijker te bereiden.

ILSE BUDDE ¹⁴⁵⁾ onderzocht 700 gevallen, waaronder 143 met actieve tuberculose; van deze laatste vielen 16 negatief uit, waaronder 3 cachectisch waren en 2 amyloïd hadden. Luetici reageerden allen positief (16 gevallen). LYDIA RABINOWITCH-KEMPNER ⁸¹⁾ verrichtte in 724 parallelonderzoekingen deze reactie naast die van BESREDKA en kreeg overeenkomstige uitslagen, evenals SCHULTE-TIGGES ²⁴⁴⁾.

HÖRING ²⁴⁵⁾ verkreeg 75.5% positief op 200 gevallen van vastgestelde tuberculose van verschillende vormen. Op 2000 contrôlegevallen: 8% onspecifieke reacties. Merkwaardigerwijs zag hij in de helft der onderzochte gevallen op den dag na het doen van de PIRQUET-huidreactie, de — tevoren negatieve — complementbindings-

reactie positief worden. Hij vraagt zich af, of dit kan berusten op een mobiliseeren der antilichamen.

HÄMEL en HORSTER¹⁴⁶⁾ schatten de reactie vlg. W. K. en K. hooger, GRAFE¹⁶⁹⁾ eveneens; KLOPSTOCK⁸³⁾ zelf zegt, dat 10—20% der luessera positief reageeren!

HÜNIGER²⁴⁷⁾: 60% van 249 gevallen van actieve longtuberculose positief, van 438 contrôlegevallen 6% positief. LEVRY²⁴⁸⁾ kan de reactie niet waardeeren voor klinisch gebruik.

F. Met de reactie van Witebsky, Klingenstein en Kuhn (W. K. en K.)

Iets uitvoeriger moet ik de uitkomsten hiermee behandelen, aangezien deze de oorzaak zijn, dat ik deze reactie heb uitgekozen voor mijn onderzoekingen.

In 1931 maken W. K. en K.²⁸⁾ de eerste resultaten bekend: bij de longtuberculose der volwassenen gemiddeld 80—90% positieve resultaten, de klinisch gezonden geven in 5 à 6% onspecifieke reacties. Luetische sera reageeren zelden positief (5%). In 1932 berichten WITEBSKY en KLINGENSTEIN²⁴⁹⁾ over specifieke bindingsproeven met hun antigeen, om zoo de differentieering tusschen lues en tuberculose in vele gevallen nog mogelijk te maken. WITEBSKY¹²²⁾ bewijst op deze wijze, dat we bij de tuberculose reactie met dit antigeen met een specifieke antigeen-antilichamen-reactie te doen hebben.

WITEBSKY en KLINGENSTEIN²⁵⁰⁾ deelen in 1933 mede, reeds ongeveer 20.000 sera onderzocht te hebben, en vonden bij ongeveer 85% der longtuberculose van volwassenen positieve reacties, bij 10 gevallen van tuberculeuze peritonitis echter negatieve. Luessera reageeren in 6—7% positief. Contrôlegevallen bij patienten zonder tuberculose en bij gezonden: 2—4% positief.

KINDERMANN en SCHRAMEK¹³⁵⁾ achten de reactie van diagnostische waarde. De specificiteit ten opzichte van lues is groot. GRAFE¹⁶⁹⁾ onderzocht met twee antigenen, dat van W. K. en K. en van NEUBERG-KLOPSTOCK en vond het eerste veel beter: op 86 tuberculosepatienten: actieve longtuberculose (N.-K.) 30% positief, (W. K. en K.) 80% positief; inactieve longtuberculose: (N.-K.) alles negatief, (W. K. en K.) 60% positief. Sterke specificiteit ten opzichte van lues.

RORDORF²²⁹⁾: 105 tuberculosepatienten: 32.3% positief. NAGELL²⁵¹⁾ vindt, dat de reactie van MEINICKE niets beter is en zelfs minder specifiek ten opzichte van lues. HÄMEL en HORSTER¹³³⁾ deden vergelijkende onderzoekingen met het antigeen van W. K. en K. en dat van NEUBERG-KLOPSTOCK, vonden het eerste beter, bij actieve

longtuberculose 79% positieve resultaten; van 20 luessera slechts één positief.

BECK en SCHEDTLER ²⁵²⁾: 145 tuberculosepatienten: 63.4% positief. BÖHN en GRÜNER ²⁵³⁾: 103 tuberculosepatienten: 39.8% positief. Bij de contrôle-gevallen blijkt de reactie volgens MEINICKE specifieker. Ze werken echter met veel te kleine getallen, die bovendien niet te vergelijken zijn, daar de verschillende reacties bij verschillende groepen zijn verricht.

MÜLLER en SCHEDTLER ¹⁷⁸⁾ vonden bij actieve longtuberculose 95% positief. Zij vermelden echter een groot percentage onspecifieke reacties (17.4%), zoodat de reactie waarschijnlijk te spoedig positief gerekend is en niet voldoende is gelet op een inderdaad volledige remming der haemolyse.

HORSTER en HÄMEL ²⁵⁴⁾: actieve longtuberculose: 77% positief. 1100 contrôlegevallen: 14 positief = 1.3%! HÖRING ²⁵⁵⁾: antigeen van W. K. en K. geeft betere resultaten dan alle vroegere antigenen.

STAHN ²⁵⁶⁾ vond bij exsudatieve gevallen van longtuberculose 80% positief, bij productief-cirrhotische 61.4%. Op 112 luessera reageerden 30 positief! Sloot hij de luessera uit, dan was 9.5% der 787 contrôle's positief, waaronder nog de sera van 13 kraamvrouwen, die vaak een positieve reactie geven.

ERNST ²⁵⁷⁾: 758 gevallen van actieve longtuberculose: 62.9% positief, naar stadia verdeeld:

	<i>pos.</i>	<i>%</i>	<i>neg.</i>	<i>%</i>	<i>dub.</i>
Turban stad. I.	29	32.9	58	65.9	1
„ „ II.	77	48.1	82	51.3	1
„ „ III.	371	72.7	137	26.9	2
	477	62.9	277	36.6	4

Van 292 gevallen van open longtuberculose waren 69.6% positief, van 185 gevallen van gesloten longtuberculose waren 54.7% positief.

De reactie is volgens ERNST alleen eenigszins regelmatig positief bij de geïsoleerde orgaantuberculose der volwassenen.

GUDEHUS ⁹²⁾ onderzocht 570 gevallen: Open longtuberculose gaf in 54.5% positieve uitkomsten. Deze schrijver vraagt zich af, of we in verband met de eigenaardigheden van de tuberculose als ziekte, wel ooit een hooger percentage zullen kunnen bereiken.

DISSMANN en DISSMANN-WOSAK ¹⁷⁹⁾ onderzochten 127 tuberculosepatienten en vonden de reactie vlg. MEINICKE iets gevoeliger, de

specificiteit echter geringer. SCHUTZ²⁵⁸⁾ begaat weer de fout, een percentage te berekenen van een 50-tal gevallen en in zijn vergelijking met de gegevens van W. K. en K. zelf, geen rekening te houden met de gemiddelde fout. Zoo vindt hij bij 50 gezonden 6 maal een positieve reactie en spreekt dan van een percentage van 12%, terwijl W. K. en K. opgeven: 2.4%.

AOKI en TSUDOMI²⁵⁹⁾ onderzochten 199 patienten, waaronder 76 met actieve longtuberculose, waarvan 46 positief reageerden.

BRANDT en V. AICHBERGEN⁹⁶⁾ vonden een zeer hoog percentage hunner uitkomsten positief, doch dit is grootendeels een gevolg van het feit, dat ze ook gedeeltelijke haemolyserepressingen positief rekenen. Ook maken ze m.i. een fout bij de berekening van het gemiddelde percentage. Ze onderzochten 724 contrôlegevallen, waarvan 17% positief reageerden! Onspecifieke reacties kwamen ook voor bij zware anaemie en beginnende catarrhale icterus. Uit het groote aantal onspecifieke reacties blijkt reeds, dat de schrijvers een reactie te spoedig als positief hebben beschouwd.

BESTAZZI²⁶⁰⁾ paste de reactie van W. K. en K. toe met een wijziging volgens SECHI, waarbij aan het mengsel van patientenserum, antigeen en complement, dadelijk het haemolytisch systeem werd toegevoegd, dus zonder voorafgaande binding. De resultaten werden daardoor scherper en specifieker.

ZINK¹⁶⁴⁾ komt in een overzichtsreferaat tot de conclusie, dat in de serodiagnostiek der tuberculose, de complementbindingsreacties het meest betrouwbaar zijn, en dat bij deze in de eerste plaats die van BESREDKA en van W. K. en K. genoemd moeten worden.

Diagnostische reacties met behulp van S.- en R.-varianten der tuberkelbacillen.

Het was te verwachten, dat na de onderscheiding van S.- en R.-varianten der tuberkelbacillen, ook hiervan gebruik gemaakt zou worden. SAENZ en COSTIL zeggen van deze varianten, die gedifferentieerd worden naar hun groeiwijze op den voedingsbodem van LOEWENSTEIN:

„L'Aspect sec, rugueux, poudré, caractéristique du bacille humain est toujours conservé d'où le nom de colonies R. (rough, rugueux) que leur donnent les auteurs anglais”.

Van den S-variant zeggen ze het volgende:

„elles (d.w.z. de kolonies van bovine tuberkelbacillen) sont humides, brillantes et lisses d'où le nom de variété S (smooth) que leur ont donnés les auteurs anglais”.

RICE, ORR en REED ²⁶¹⁾ waren de eersten, die dergelijke antigenen voor de diagnostiek der tuberculose trachtten te gebruiken. Ze bepalen de z.g.n. antilichamenindex, die men verkrijgt door de hoeveelheid door het S.-antigeen gebonden complement te deelen door de hoeveelheid door het R.-antigeen gebonden complement, omdat ze opgemerkt hadden, dat zware gevallen veel complement bonden met S.-antigeen en relatief weinig met R.-antigeen, terwijl de lichte gevallen met beide antigenen ongeveer evenveel complement bonden. Hun resultaten, verkregen bij 100 gevallen van open tuberculose, waren niet hoopvol. Ze komen echter nog niet tot een bepaalde conclusie. Hun antigenen, waterige extracten uit S.- en R.-cultures van tuberkelbacillen, zijn dan ook zeer ongeschikte antigenen.

REED, RICE, ORR en GARDINER ²⁶²⁾ onderzochten met dergelijke antigenen 144 patiënten met longtuberculose. Bij zware gevallen is de index groter dan 1.75. Hoe kleiner de index in het beloop der ziekte wordt, hoe gunstiger de prognose.

TUNNICLIFF e.a. ²⁶³⁾ gebruikten een suspensie van tuberkelbacillen van S.- en R.-varianten in zoutoplossing (op zich zelf dus een zeer ongeschikt samengesteld antigeen) en verkregen met den S.-variant 90% positieve complementbindingsreacties bij tuberculose, met de R.-variant 30%.

Hoewel het aantal onderzoeken nog onvoldoende is om zich een oordeel te vormen, lijken ons toch reeds de op deze wijze verkregen uitkomsten niet bemoedigend. Misschien zullen antigenen uit deze varianten, bereid op de wijze van W. K. en K., betere resultaten geven.

EIGEN ONDERZOEK.

PRACTISCHE UITVOERING DER REACTIE
VOLGENS WITEBSKY, KLINGENSTEIN EN KUHN OP TUBERCULOSE.

A. *Benoodigdheden:*

ANTIGEEEN.

Antigeen volgens WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN is in den handel verkrijgbaar. (Dit is te betrekken bij Bayer: Meister-Lucius-Behringwerke, Marburg-Lahn). Voor het gebruik wordt in een porceleinen schaalje de benoodigde hoeveelheid (ongeveer 1 cc. voor 4 reacties) op een waterbad bij 60° à 80° C. verwarmd, totdat de benzol juist verdampt is. Het verdampingsresidu wordt met een dubbel vol. (betrokken op de oorspronkelijke hoeveelheid) 0.9% Na.Cl. opl. tot een zoo homogeen mogelijke suspensie gebracht. Om dit te bereiken wordt de hoeveelheid Na.Cl. opl. slechts langzamerhand toegevoegd en in het begin zelfs druppelsgewijze, terwijl na iedere toevoeging grondig gewreven wordt met de ronde zijde van een glasstaafje.

Van het antigeen worden nu nog 5 verdunningen met 0.9% Na.Cl. opl. gemaakt en wel zoodanig, dat iedere verdunning 3 keer zoo slap is als haar voorgaande. Op deze wijze hebben we dus antigenen in 6 sterkten, n.l. onverdund, 3, 9, 27, 81 en 243 keer verdund antigenen.

SERUM; PUNCTAAT.

Het heldere patientenserum of eventueel punctaat wordt gedurende een half uur bij 56° C. geïnactiveerd. Voor meerdere specificiteit is het dikwijls gewenscht WASSERMANN-positieve sera van luespatienten bij 59°—61° C. te inactiveren.

De proef wordt uitgevoerd met serum of punctaat, dat met 0.9% Na.Cl. opl. 3 keer verdund is, door b.v. aan 0.8 cc. serum of punctaat 1.6 cc. Na.Cl. opl. toe te voegen.

Bij in sterke mate pus bevattende punctaten gelukt het dikwijls niet door centrifugeeren helder vocht te verkrijgen, terwijl de pus bevattende massa als zoodanig ongeschikt is voor de uitvoering der reactie tengevolge van de anticomplementaire werking der cellen. In die gevallen konden we de reactie dikwijls met succes als volgt uitvoeren: De pusmassa als zoodanig wordt geïnactiveerd, vervolgens

gemengd met een dubbel vol. 0.9% Na.Cl opl. en dan gedurende een half uur in de schudmachine geplaatst, daarna gecentrifugeerd. Het heldere of opalescente centrifugaat wordt dan zonder verdere verdunning voor de reactie gebruikt.

HAEMOLYTISCH SYSTEEM.

Het haemolytisch systeem wordt samengesteld op dezelfde wijze als bij de uitvoering der WASSERMANN-reactie op lues te doen gebruikelijk is. Een 5%-suspensie van gewassen schapenbloedlichaampjes wordt gemengd met een gelijk vol. van een amboceptor-verdunning in 0.9% Na.Cl. opl. De hoeveelheid amboceptor in deze laatste moet minstens het viervoudige bedragen van die, welke juist in staat is haemolyse tot stand te doen komen.

COMPLEMENT.

Als complement wordt caviaserum gebruikt, waaraan de 14-voudige hoeveelheid 0.9% Na.Cl. opl. is toegevoegd.

B. *Uitvoering der reactie.*

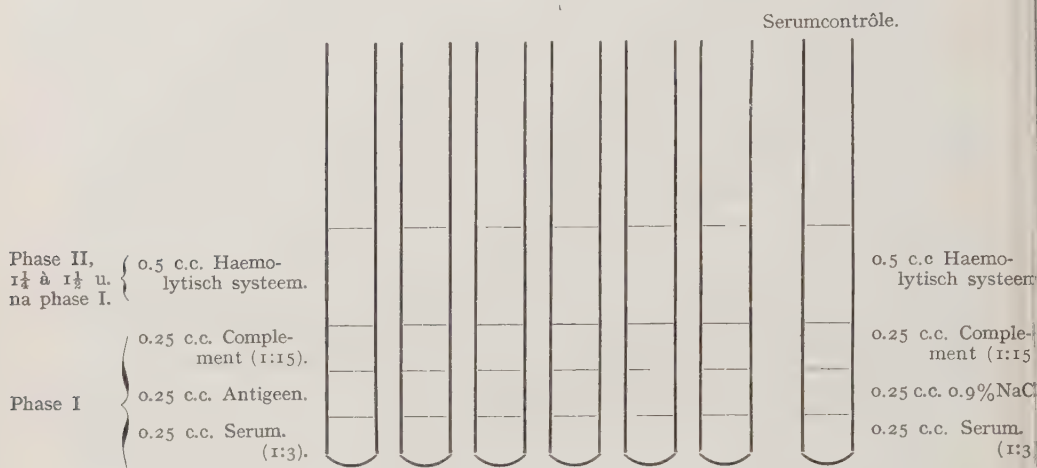
VOORPROEF.

Speciaal in de gevallen, waarbij een aantal proeven tegelijkertijd wordt verricht, is het wenschelijk om van te voren vast te stellen, dat complement en haemolytisch systeem in tegenwoordigheid van de verschillende antigeenverdunningen behoorlijk werkzaam zijn. Men plaatst daartoe 7 buisjes in een rekje, in het 1ste buisje brengt men 0.25 cc. onverdund, in het 2de buisje 0.25 cc. 3 keer verdund antigeen enz., in het laatste buisje 0.25 cc. phys. Na.Cl. opl. Vervolgens in ieder buisje 0.25 cc. 0.9% Na.Cl. opl., daarna 0.25 cc. complement, de buisjes worden nu gedurende 1 uur bij 37° C. geplaatst, waarna 0.5 cc. haemolytisch systeem wordt toegevoegd. Men moet nu als eisch stellen, dat alle buisjes binnen 15 à 20 min., geplaatst bij 37° C., volkomen haemolyse vertoonen. Volgens onze ervaring helderen de buisjes, welke relatief het meeste antigeen bevatten, het langzaamst op.

EIGENLIJKE PROEF.

Hierna wordt dan de eigenlijke proef verricht; het is noodzakelijk hierbij te laten medelopen de antigeen-contrôles (als boven) en bovendien een zeker positief en een negatief reageerend serum. Bij de uitvoering der reacties worden nu voor ieder serum of punctaat 7 buisjes in een rekje geplaatst. In ieder buisje komt nu 0.25 cc. serum of punctaat (1 : 3), 0.25 cc. antigeenverdunning (in afdalende sterkte),

doch in het 7e buisje (serumcontrôle) in de plaats van antigeen 0.25 cc. 0.9% Na.Cl. oplossing; daarna 0.25 cc. complement (1 : 15), de buisjes worden nu $1\frac{1}{4}$ à $1\frac{1}{2}$ uur in de broedstoof geplaatst. Hierna wordt 0.5 cc. haemolytisch systeem toegevoegd. Het plaatsen der rekjes in een waterbad van 37° C., nadat het haemolytisch systeem is toegevoegd, vergemakkelijkte ons de aflezing in hooge mate.



A f l e z i n g.

PROTOCOL.

Serum v. Pat.	I.		II.		III.		IV.		V.		VI.		Con- trôle.	
	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β		
A.	geen haem.	geen haem.	geen haem.	geen haem.	geen haem.	geen haem.	geringe haem.	matige haem.	geringe haem.	matige haem.	totale haem.	totale haem.	totale haem.	posi- tief.
B.	geen haem.	geringe haem.	geringe haem.	matige haem.	totale haem.	totale haem.	totale haem.	totale haem.	totale haem.	totale haem.	totale haem.	totale haem.	totale haem.	nega- tief.
C.	totale haem.	totale haem.	totale haem.	totale haem.	geen haem.	geen haem.	geen haem.	geen haem.	geringe haem.	matige haem.	totale haem.	totale haem.	totale haem.	posi- tief.

α = 1e aflezing.

direct na haemolyse der contrôle's.

β = aflezing.

na een uur.

Techniek der aflezing der resultaten.

Hierin ligt m.i. een belangrijke foutenbron. Het komt n.l. bij al deze reacties, waarbij het optreden van haemolyse de negativiteit der reactie bewijst, voor, dat men kan redetwisten over het al of niet aanwezig zijn van haemolyse, eventueel het al of niet bestaan van volledige remming der haemolyse. Door centrifugeeren is het mogelijk een zelfs geringe haemolyse te constateeren, doch indien dit verzuimd wordt, kan men door het voorbarig vaststellen van volledige remming der haemolyse, de resultaten schijnbaar veel verbeteren.

Waardeering der aflezing.

Daar door onnauwkeurigheid hierin, een groote verschuiving naar beide kanten kan plaats hebben, hebben W. K. en K.²⁸⁾ dadelijk aangegeven, dat een reactie pas dan positief genoemd mag worden, als in minstens 2 buisjes, dus met 2 verschillende antigeenverduunningen volledige haemolyse bereikt is. Ze staan op het standpunt, dat men het resultaat op 2 verschillende tijden af moet lezen: 1e. direct na opheldering der contrôle's. 2e. na nog een uur bij 37°. Ze zeggen echter uitdrukkelijk, dat de eerste aflezing den doorslag geeft. Hier doen zich twee bezwaren tegen deze wijze van doen voor.

Het is mij bij herhaling gebleken, dat er na eenigen tijd volledige opheldering optrad, als bij de aflezing, zooals de schrijvers die toepassen, volledige remming bestond. Een te spoedige aflezing, zelfs na volledige opheldering van alle contrôle's, is dus niet wenschelijk. Een tweede moeilijkheid bij het volgen van het voorschrift dezer schrijvers is, dat een beginnende d.w.z. een zeer geringe haemolyse van complete remming nauwelijks te onderscheiden is, en dit is zeker het geval, als de overgebleven bloedlichamen nog homogeen gesuspendeerd zijn, zooals dat in den aanvang zal zijn. Dat W. K. en K. zoo betrekkelijk scherp hebben aangegeven, wanneer een reactie positief genoemd mag worden, is, zooals vanzelf spreekt, uit empirische overwegingen geschied. Immers, rekent men ook de reactie met geringe remming positief, waartoe men zou kunnen komen, omdat ook in die gevallen complement gebonden wordt en dus, oppervlakkig gezien, antilichamen voor moeten komen, dan krijgt men daardoor zooveel meer onspecifieke positieve reacties, dat de methode onbruikbaar wordt. Stelt men daarentegen te strenge eischen, dan vindt men te weinig positieve reacties, krijgt dus een geringe gevoeligheid.

Bij alle soortgelijke reacties heeft men met deze zelfde soort moeilijkheden te kampen en W. K. en K. hebben de quaestie op grond van hun ervaringen zóó opgelost, als reeds beschreven is.

De complementbindingsreactie van W. K. en K. werd in 868 verschillende menselijke bloedsera verricht, in bijna alle gevallen ook de reactie van WASSERMANN en de citocholreactie op lues.

383 leden aan den een of anderen vorm van tuberculose, 485 leden aan ziekten, die niets met tuberculose te maken hadden of waren geheel gezond.

De 383 lijders aan tuberculose moet men, om de waarde der reactie te beoordeelen, indeelen naar den aard en ernst der aandoening. Hiervoor gebruikte ik de volgende indeeling:

I. Longtuberculose: (364 gevallen).

- a. lichte aandoeningen, waaronder ik versta: inactieve tuberculose van geringe uitbreiding, b.v. een oude topsclerose.
- b. actieve longtuberculose, beperkt tot één longkwab en meer uitgebreide, doch inactieve tuberculose, uitgezonderd de caverneuze longtuberculose.
- c. actieve longtuberculose van meer dan één kwab.
- d. caverneuze longtuberculose.

Deze laatste categorie heb ik apart genomen, omdat de meeste onderzoekers meenen, dat het grootste aantal positieve reacties voorkomt bij de caverneuze longtuberculose.

II. Tuberculose van andere organen, klieren, beenderen enz. zonder aantoonbare longtuberculose.

We vinden dan de volgende cijfers:

I. Longtuberculose.

	to- taal	+	—	dub.	%+	%—
inactief	26	4	22	—	15.4	84.6
actief, weinig uitgebreid	56	5	51	20	9	91
actief, uitgebreid	60	34	26	2	56.6	43.4
caverneuze longtuberculose	222	151	71	4	68	32
Totaal	364	194	170	26	53.3	46.7

Hierbij noem ik bij de rubriek „dubieus” die uitkomsten, die W. K. en K. positief rekenen, daar in 2 buisjes bij eerste aflezing volledige remming bestaat, doch die ik tot de negatieve reken, daar ze later geheel of gedeeltelijk ophelderen. Deze gevallen heb ik dus als

negatief gerekend, zooals uit de tabel is af te lezen. Ik heb ze alleen apart genoemd, om te demonstreeren, op welke wijze de percentages er door beïnvloed zouden kunnen worden.

Op 364 gevallen van longtuberculose vond ik dus 53.3% positieve resultaten, 46.7% negatieve. Berekent men echter het percentage positieve en negatieve reacties, zooals dit er uit zou zien, als van alle categorieën evenveel gevallen aanwezig waren geweest, dan vindt men slechts 38% positieve en 62% negatieve reacties. Dit zijn dan dus eigenlijk de percentages, die in dit onderzoek met de reactie van W. K. en K. bij alle gevallen van longtuberculose door elkaar, gevonden zijn.

Het grootste percentage positieve reacties vinden we bij de groep: caverneuze longtuberculose. Dit betrekkelijk hoge percentage wordt aanzienlijk gedrukt bij de berekening van het percentage positieve gevallen van het totale aantal.

De getallen, die in de andere groepen voorkomen, zijn te klein om er betrouwbare statistische gegevens van te maken. De ware waarde van deze percentages ligt tusschen zulke wijde grenzen, dat we te grove fouten zouden maken, door een gemiddelde waarde te nemen. Om een voorbeeld te noemen:

Tot de derde groep behooren 60 gevallen, waarvan 34 positief, 26 negatief reageeren, dus oogenschijnlijk 56.6% positief en 43.4% negatief. De ware waarde van het percentage positieve uitkomsten ligt echter tusschen 37.8% en 75%.

Hoe kleiner de getallen, waarmee we werken, hoe belangrijker de gemiddelde fout wordt. Deze kleine getallen mogen dan ook slechts onder groot voorbehoud in een statistiek verwerkt worden, temeer daar bij de tuberculose toch reeds zoovele factoren de nauwkeurigheid der uitkomsten ongunstig beïnvloeden. Ook bij de vergelijking der uitkomsten van verschillende schrijvers speelt de gemiddelde fout een uiterst belangrijke rol.

Gaan we nu over tot een vergelijking met de resultaten, die anderen met de zelfde reactie verkregen. Zooals reeds uiteengezet is, is het vergelijken van eigenlijk onvergelykbaar materiaal een zeer lastige quaestie, daar er teveel foutenbronnen bestaan. Een zuivere vergelijking is dan ook geheel onmogelijk en ik doe dit ook alleen om een, zij het oppervlakkigen, indruk te geven van het door ons verkregen resultaat. We moeten ons er echter terdege van bewust zijn, dat de gegeven cijfers met groote reserve beschouwd moeten worden en dat in ieder geval bij het trekken van conclusies uit eventueel gevonden verschillen ook gerekend moet worden met de gemiddelde fout, ware waarde, enz. Hiervan zal ik dan ook, waar het noodig is, gebruik

maken, doch dezelfde wetten gelden natuurlijk voor alle gevallen, waarbij over percentages gesproken wordt.

Zoodra men geen gelijksoortige indeeling der gevallen en van alle categorieën niet evenveel gevallen gebruikt, komt men eveneens tot onzuivere uitslagen. Ik zal daarom 'eerst enkele schrijvers noemen, die de gevallen van geïsoleerde en caverneuze longtuberculose apart bespreken.

KLINGENSTEIN ²⁶⁴) heeft op 668 gevallen van geïsoleerde longtuberculose 535 positieve reacties gevonden, 36 dubieuze. Deze laatste moeten we echter m.i., evenals ik dit in mijn eigen cijfers heb gedaan, tot de negatieve rekenen. We komen dan tot 80.1% positieve resultaten, en 19.9% negatieve.

Ik vond 68% positief en 32% negatief voor de caverneuze longtuberculose, dus een aanzienlijk verschil, dat niet op toevallige omstandigheden kan berusten. KLINGENSTEIN vindt dus bij een categorie, die ook nog veel meer gevallen omvat, een hooger percentage. Hier moeten dus technische of andere bijzonderheden in het spel zijn.

ERNST ²⁵⁷) vond 69.6% der gevallen van open longtuberculose positief; deze gevallen reken ik eenvoudigheidshalve gelijkwaardig aan „caverneuze longtuberculose” uit mijn tabel. MÜLLER en SCHEDTLER ¹⁷⁸) vonden bij caverneuze longtuberculose 95% positief. GUDEHUS ⁹²) vond 54.5% positief.

Vóór een nadere bespreking der oorzaken van deze verschillen, zal ik echter in het kort nog eenige schrijvers aanhalen, die dezelfde, betere of ongunstiger uitkomsten hadden dan mijn cijfers aangeven. Hierbij geven de schrijvers meestal een andere indeeling hunner gevallen, dan ik gevolgd heb, zoodat het hier gewenscht is, de positieve uitslagen op het totale aantal gevallen van longtuberculose te geven. Merkwaardig is het, dat men bij het nagaan der verkregen percentages bij alle schrijvers stuit op de onnauwkeurigheid, dat het gemiddelde percentage berekend wordt, door het aantal positieve uitkomsten te deelen op het totale aantal onderzochte gevallen, in plaats van de eenige juiste berekeningswijze te gebruiken, door het gemiddelde te nemen van de percentages positieve uitkomsten der verschillende categorieën. Ik heb daarom achter de uitkomsten der verschillende schrijvers het percentage geplaatst, zooals we dit m.i. voor een behoorlijke vergelijking der cijfers moeten gebruiken.

Ik vond dan op 364 longtuberculose-gevallen schijnbaar 53.4% positief (194) en 46.6% negatief (170, waarvan 26 dubieus), doch zooals gezegd, volgens een meer juiste opvatting der percentageberekening: 38% positief en 62% negatief.

HÄMEL en HORSTER vonden 66% positief (47.9%); BÖHN en GRÜNER 39.8%; DISSMANN en DISSMANN-WOSAK: 55.1% (48.8%); AOKI en TSUDOMI: 48% (35%); BECK en SCHEDTLER: 70.2%; MÜLLER en SCHEDTLER: 56.6%.

Hieruit is af te leiden, dat de door mij verkregen resultaten niet tot de slechtste behooren, doch ook niet gunstig tegen vele anderen afsteken. We hebben reeds besproken, welke de oorzaken van deze groote verschillen kunnen zijn bij een techniek, die bij alle schrijvers nagenoeg dezelfde was.

Aan mijn materiaal heb ik nog eens uitgerekend, welk verschil het uitmaakt, of een reactie positief wordt genoemd, indien er volledige remming is bij directe aflezing of na aflezing eenigen tijd later. Op alle bepalingen, uitgevoerd in bloedserum (868) zou het directe aflezen 27 positieve reacties en 11 onspecifieke reacties meer opgeleverd hebben. Het aflezen na eenige minuten à 1 uur, heeft dus ons percentage positieve gevallen verlaagd, de specificiteit der reactie echter aanzienlijk verhoogd.

De meeste schrijvers geven op, zooals reeds vermeld werd, dat in bepaalde stadia der tuberculeuze infectie, zgn. 2e stadium van RANKE, exacerbaties e.a., de reactie negatief kan zijn en raden daarom aan, de reactie met geregelde tusschenpoozen te herhalen, waardoor het aantal positieve uitkomsten verhoogd kan worden. Wellicht ligt hierin ook een der oorzaken, dat ik betrekkelijk weinig positieve reacties vond, omdat ik de reactie bij eenzelfde patient slechts éénmaal verrichtte. Hierop maakte ik een enkele uitzondering, die het vermelden waard is, daar ze, althans voor een enkel geval, de meening dezer schrijvers onderstreept:

Pat. A. Op 23-11-'34 onderzocht ik het bloedserum:

W. K. en K. negatief. Hij had toen een infiltraat met caverne in de linker bovenkwab, links was een pneumothorax aangelegd, waardoor het sputum negatief geworden was. Vlak daarna kreeg deze patient een heftige pleuritis exsudativa, vervolgens uitgebreide lymphklierveretteringen! Lang en ernstig ziekbed.

30-8-'35. Toestand is uitstekend. W. K. en K. nu positief!

Deze patient verkeerde dus bij het eerste onderzoek in een toestand van verhoogde gevoeligheid voor infectie, kreeg pleuritis en lymphklierveretteringen („secundaire allergie”), had daarbij geen of weinig antilichamen in het bloed. Toen dit stadium overwonnen was, keerden deze terug, of waren weer aantoonbaar.

Over het algemeen heb ik mij tot een éénmalig onderzoek beperkt. Het was immers niet zoozeer mijn bedoeling, om zooveel mogelijk

te kunnen zeggen, dat bij iedere tuberculose een positieve reactie voorkomt, doch meer om uit te maken, welke de waarde voor de diagnostiek kon zijn.

II. *Extrapulmonale tuberculose.*

Hoewel het niet de bedoeling is, extrapulmonale tuberculose tot een hoofdpunt in dit proefschrift te maken, zal ik toch even de uitkomsten vermelden, die ik verkregen heb:

20 gevallen werden onderzocht, waarbij:

urogenitaaltuberculose: 4, hiervan 1 positief;

peritonitis tuberculosa: 7, hiervan 4 positief;

spondylitis tuberculosa en koude abscessen van onbekenden oorsprong: 6, hiervan 2 positief;

pericarditis tuberculosa: 2, beide negatief;

erythema nodosum op tuberculeuzen grondslag 1: negatief.

Al deze gevallen betroffen patienten, die reeds geruimen tijd ziek waren en opgenomen werden, omdat behandeling of verpleging thuis verder onmogelijk was. Het stadium der haematogene verspreiding, dat volgens de literatuur de tuberculose-antilichamen zoo vaak tijdelijk doet verdwijnen, was hier dus zeer waarschijnlijk reeds voorbij. Een toestand van betrekkelijk evenwicht tusschen infectie en immuniteit was bereikt, zoodat de invloed van het secundair-allergische stadium niet meer in aanmerking kwam, behalve bij het ééne geval van erythema nodosum.

Zooals steeds is het berekenen van een percentage zeer gevaarlijk, doch hoeveel te meer bij deze extrapulmonale tuberculose, waar zoovele soorten door elkaar onderzocht zijn. Wij vonden op 20 gevallen 7 positief = 35%. BECK en SCHEDTLER²⁵²⁾ vinden op 31 gevallen 11 positief: 35.5%. MÜLLER en SCHEDTLER¹⁷⁸⁾ vinden bij beentuberculose 46.7% positief, doch zeggen er meteen bij, dat de reactie steeds zwak uitviel. Het is daarom voor mij eenigszins de vraag of zij zich aan de strenge voorschriften van W. K. en K. betreffende de aflezing gehouden hebben. Bij 19 gevallen van tuberculose van andere organen vonden ze 14.7% positief. Deze gevallen kunnen we min of meer vergelijken met de mijne.

POSITIEVE REACTIES BIJ GEZONDEN EN BIJ PATIENTEN, DIE NIET AAN TUBERCULOSE IN EENIGERLEI VORM LIJDEN.

Hoewel oppervlakkig bekeken, het resultaat der diagnostische reacties bij lijders aan tuberculose van het meeste belang moet zijn

— inderdaad hebben sommige onderzoekers zich beperkt tot het onderzoek bij tuberculosepatienten — heeft toch het percentage positieve reacties bij andere aandoeningen en bij gezonden een bijna nog grootere beteekenis. Immers, indien men niet met onspecifieke en onkarakteristieke reacties rekening behoeft te houden, zou men iederen positieven uitslag als volkomen betrouwbaar diagnosticum mogen gebruiken, vrijwel onafhankelijk van het percentage positieve uitkomsten bij tuberculose. Reeds zijn in de voorgaande bladzijden allerlei factoren besproken, die het bereiken van een totale gevoeligheid in den weg staan. Evenzoo de factoren, die ons beletten een totale specificiteit te bereiken. Ook met de complementbindingsreactie, uitgevoerd volgens W. K. en K., hebben we met deze moeilijkheden te kampen, al zijn deze minder groot dan bij de andere reacties.

Als we dan onze gevallen nagaan, blijkt het, dat we als contrôle-gevallen (dus gezonden en lijders aan andere ziekten dan tuberculose) hebben onderzocht: 485 personen, waarbij we een aantal van 25 onspecifieke reacties hebben gevonden: 5.2%.

W. K. en K.²⁸⁾ vinden eenzelfde percentage: 5—6% bij klinisch gezonde individuen. In 1932 zegt WITEBSKY¹²²⁾, dat 3—5% der contrôlegevallen positief reageeren, GUDEHUS noemt 4%, BÖHN en GRÜNER 22.2% (10 positief op 45 contrôlegevallen), RORDORF 2% (1 positief op 52 gevallen); BECK en SCHEDTLER 4.2% (5 positief op 120 gevallen); HORSTER en HÄMEL 1.3% (14 positief op 1100 contrôle-gevallen); HÖRING 4%.

Het is dus duidelijk, dat onze cijfers de door anderen opgegeven waarden zeer weinig ontlopen.

Onder de genoemde 485 contrôlegevallen zijn ook begrepen 27 luetici met sterk positieve lues-WASSERMANN, bij welke we, zooals reeds eerder uiteengezet is, tweemaal een onspecifieke tuberculose-reactie gevonden meenen te hebben. Wanneer we het percentage onspecifieke reacties berekenen zonder deze luesgevallen, komen we tot een percentsgetal van 5.1%. Het aantal onspecifieke reacties bij lues gaat dus precies gelijk op met dat bij normale gevallen, waaruit we reeds mogen concludeeren, dat de lues *geen specialen invloed* heeft op den uitslag van deze tuberculosereactie! Des te meer wordt men hiervan overtuigd, indien het bij samentreffen van positieve lues- en tuberculosereactie blijkt, dat door z.g.n. verzadigingsproeven is aan te toonen, dat twee verschillende soorten antilichamen aanwezig zijn. Zooals reeds vermeld is, waren we bij twee gevallen in de gelegenheid, dit te doen op de wijze, zooals WITEBSKY en KLINGENSTEIN²⁴⁹⁾ dit hebben aangegeven: van het te onderzoeken serum, dat positief

reageerde met een tuberculose- en met een luesantigeen, wordt een gedeelte vóórbehandeld met gedroogde tuberkelbacillen, waarvan 150 mg. in 10 cM.³ physiol. zoutoplossing door centrifugeeren worden gewasschen.

De schrijvers gebruiken dus hier eenvoudig gedroogde tuberkelbacillen, waarmee ze verklaren, de antilichamen tegen tuberkelbacillen volledig te kunnen binden. Het is niet duidelijk en hierover spreken zij in het geheel niet, waarom voor deze proeven het tuberkelbacillenpoeder voldoende is, terwijl ieder zijn uiterste best doet de meest gecompliceerde antigenen uit de bacillen te maken. De oplossing van deze vraag is waarschijnlijk deze, dat het bacillenpoeder zeer goed in staat is de tuberkelbacillen-antilichamen te binden, doch dat het ongeschikt is, om specifieke complementbindingsreacties te geven.

Bij het sediment wordt 4 cc. van het 3-maal verdunde, geïnactiveerde patientenserum gebracht. Dit komt dan gezamenlijk een uur in de broedstoof, dan 2 à 3 uur in de ijskast onder geregeld schudden. Daarna wordt gecentrifugeerd, eventueel herhaaldelijk, of gefiltreerd. Vervolgens nog 10 min. bij 56° voor het uitschakelen van anticomplementaire werking.

Een ander gedeelte van het serum wordt vóórbehandeld met een alcoholisch runderhartextract (het gewone antigeen voor de WASSERMANN-reactie op lues). 30 cM.³ worden ingedampt en gewasschen in physiol. zout. Bij het sediment 4.5 cM.³ van het te onderzoeken serum, dat geïnactiveerd en 3-maal verdund is. Verder volgt dezelfde werkwijze als bij de eerstgenoemde proef. Daarna heeft het volgende plaats:

telkens $\frac{1}{4}$ cM.³ van een 15-maal verdund caviaserum met
telkens $\frac{1}{4}$ cm.³ van het 3-maal verdunde patientenserum

(1e. natief,

2e. na voorbehandeling met tuberkelbacillen,

3e. na „ „ runderhartextract),

en afnemende hoeveelheden van a) het tuberculoseantigeen, b) het WASSERMANN-antigeen, gedurende $1\frac{1}{2}$ uur bij 37°. Vervolgens wordt het haemolytisch systeem toegevoegd.

We zagen dan:

1. het natieve serum geeft haemolyseremming met beide antigenen.
2. het met tuberkelbacillen voorbehandelde geeft alleen remming met het runderhartextract.
3. het met runderhartextract voorbehandelde geeft alleen remming met het tuberculoseantigeen.

Uit deze proeven mag men dus afleiden, dat beide sera een specifieke complementbindingsreactie met lues- en met tuberculose-antigeen gaven, dus antilichamen bevatten, zoowel tegen lues-, als tegen tuberculose-antigeen, m.a.w. beide patienten hadden lues en tuberculose.

Als we de gevallen, die een onspecifieke reactie gaven, nu eens nader beschouwen, blijkt het, dat hier gevallen bij voorkomen, die het begrijpelijk maken, dat serumreacties hierbij onbetrouwbaar moeten zijn.

Zoo komt men tot deze conclusie bij een patient als de volgende:

Patient X wordt binnengebracht in diabetisch coma, met alle verschijnselen daarvan. Urine: alb. positief, reductie + + +, aceton + +, diaceetzuur +; alkalireserve 37.5; ureumgehalte bloed: 2.34 gr. per L. Het kort na de opname afgenomen bloed vertoont een positieve tuberculosereactie, lues-WASSERMANN negatief. Wegens de tengevolge van een pneumonie en gangraen snel verergerende toestand van den patient werd de reactie niet herhaald. Ik meen, dat in dit geval de bloedsamenstelling dermate veranderd is geweest, dat we ons niet over een abnormale tuberculosereactie mogen verwonderen. Men krijgt bij deze toestanden immers een overstrooming van het bloed met neutraalvet en lipoiden ²⁶⁵⁾ en aangezien het tuberculose-antigeen juist zoo is samengesteld, dat het van bepaalde lipoiden weinig bevat, is het niet onmogelijk, dat deze nu juist weer in het bloed voorkwamen, zoodat er voor het tot stand komen van een positieve reactie optimale verhoudingen bestonden.

Ook bij het volgende geval is een afwijkende reactie wel bijna te verwachten:

Vrouw van 40 jaar.

Chloranaemie, hooge temperatuur, haemoglobine 18 Sahli, erythrocyten 1.480.000, lues-WASSERMANN negatief, geen tuberculose aantoonbaar, tuberculosereactie positief. Ook bij dergelijke zware anaemieën heeft een ingrijpende wijziging plaats in de chemische, vooral ook de colloïdchemische bloedsamenstelling. BLOOR en MAC PHERSON ²⁶⁶⁾ vonden immers, dat bij zware anaemie in het plasma optreden: 1e. vermeerdering van de vetten, 2e. vermindering van cholesterine, 3e. vermindering van de lecithine.

Ook BRANDT en v. AICHBERGEN ⁹⁶⁾ vonden bij zware anaemieën veel onspecifieke reacties, al moeten hun cijfers om reeds aangegeven redenen met voorzichtigheid beoordeeld worden.

Het is verder bekend, dat malaria vaak de oorzaak is van een onspecifieke reactie. Daar de malaria onder mijn materiaal zeer weinig voorkwam, heb ik slechts één geval kunnen waarnemen:

Meisje van 14 jaar.

Typische malaria met koorts en parasieten in het bloed. Lues-reacties: WASSERMANN, KAHN positief, MEINICKE en MÜLLER negatief. De beide ouders hadden een negatieve WASSERMANN, zoodat congenitale lues onwaarschijnlijk was en de positieve luesreacties toegeschreven moesten worden aan de malaria, hetgeen een veel voorkomend verschijnsel is. Ook de tuberculosereactie was sterk positief. Klinisch was geen tuberculose aantoonbaar. PIRQUET matig positief. Twee weken, nadat de koorts verdwenen was, was de tuberculosereactie nog steeds even sterk positief, twee maanden later negatief, evenals de lues-WASSERMANN. Beide positieve reacties waren dus het gevolg der malaria-infectie.

Ook een *icterisch serum* gaf een onspecifieke reactie.

Man van 52 jaar.

Alle symptomen van cirrhosis hepatis (Laennec). Icterus. Bloedserum: directe H. v. D. BERGH: 4 Eenheden; PIRQUET zwak positief; bezinking: 31 mM. na 1 uur (WESTERGREN). WASSERMANN negatief, W. K. en K. positief. Bij dit geval moet ook rekening gehouden worden met de mogelijkheid, dat het ontstaan der positieve tuberculosereactie begunstigd werd door de bij deze cirrhose sterk gewijzigde verhoudingen der eiwitfracties.

Hierbij wil ik ook nog 3 gevallen vermelden, waarbij de W. K. en K. volgens de opvatting van WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN zelf, positief genoemd zou moeten worden, die wij echter negatief noemen.

Patient M.

Chronische glomerulonephritis. Ureumgehalte van het bloed: 0.714 gr. per L. Bezinking: 104 mM. na 1 uur (WESTERGREN). Cardiale oedemen. WASSERMANN negatief. PIRQUET negatief. Bilirubine bloedserum: directe reactie 2 Eenheden. W. K. en K. zwak positief.

Patient T.

Bilieuze pneumonie. Ozaena. Hooge koorts. Ureumgehalte van het bloed: 1 gr. per L. WASSERMANN + 10. W. K. en K. zwak positief.

Patient U.

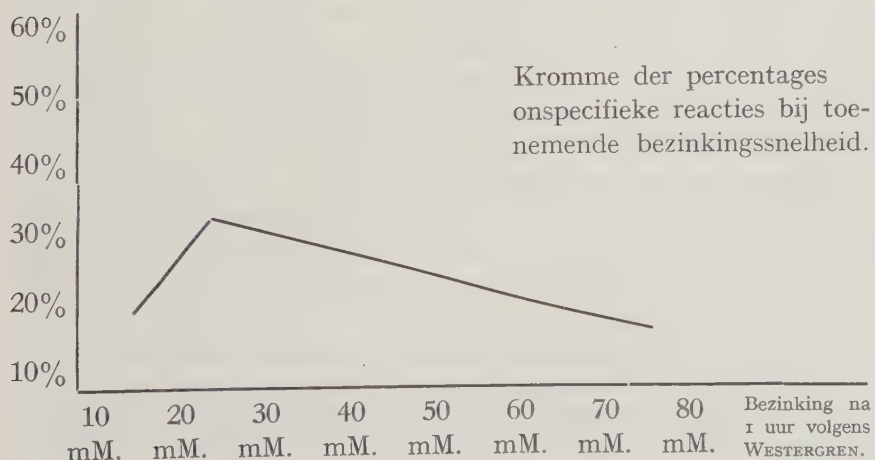
Coeccumcarcinoom met levermetastasen. Icterus. Bilirubine bloedserum: directe reactie 6 Eenheden. Bezinking: 43 mM. na 1 uur (WESTERGREN). WASSERMANN: negatief. W. K. en K. zwak positief.

Ik beschrijf deze gevallen hierom, omdat de tuberculosereactie blijkbaar wel de neiging heeft, om positief te worden, al treedt er geen voldoende remming op, om duidelijk positief te worden. In het geheel onderzocht ik de icterische sera van 15 patienten met verschillende aandoeningen, vond daarop 1 positief.

Schakelen we onder onze 25 onspecifieke reacties die sera uit, die afkomstig zijn van patienten, die de een of andere ziekte hadden, welke misschien invloed op den uitslag der reactie kon hebben, dan houden we 14 onspecifieke reacties over. (2.9%).

Een duidelijke invloed der labiliteit van het bloedserum op den uitslag der reactie heb ik niet kunnen constateeren. Bij een hierop gericht onderzoek mijner gegevens bleek het volgende: bij 353 gevallen werd de bezinking bepaald: In 52 gevallen bestond een bezinkings-snelheid, hooger dan 40 mM. in 1 uur (WESTERGREN). In 3 dezer gevallen was de reactie onspecifiek d.w.z. er kon geen tuberculose worden aangetoond (6%). Bij 301 gevallen was de bezinkingssnelheid lager dan 40 mM. Hiervan reageerden 7 onspecifiek (2.3%). Hieruit blijkt dus niet, dat mèt het hooger worden der bezinking de kans op een onspecifieke reactie toeneemt. Immers het verschil tusschende percentages (3.7%) is veel kleiner dan driemaal de gemiddelde fout van dit verschil.

De genoemde getallen hebben echter hierom weinig waarde, omdat bij deze 353 gevallen ook veel tuberculoselidgers voorkomen, bij wie uiteraard geen onspecifieke reacties kunnen voorkomen. Zuiver zou de vergelijking alleen dan kunnen zijn, als de percentages van de gevallen van onspecifieke reacties naar de grootte der bezinkings-snelheid werden gerangschikt. Op deze wijze zal ik hier nog eens uiteenzetten, dat het aantal onspecifieke reacties niet toeneemt met het toenemen der serumlabiliteit, als maatstaf waarvoor ik de bezinkingssnelheid der erythrocyten heb genomen. Een nadeel is, dat de getallen te klein zijn voor het berekenen van percentages, doch aangezien het aantal dezer onspecifieke reacties nu eenmaal niet grooter is, heb ik ze toch in een kromme gebracht.



Uit deze kromme is af te leiden, dat met het hooger worden der bezinking het aantal onspecifieke reacties afneemt. Dit is dus een soortgelijke conclusie, als waartoe KINDERMANN en SCHRAMEK¹³⁵⁾ en ook HÄMEL en HORSTER²⁴⁶⁾ komen, dat er n.l. geen betrekkingen bestaan tusschen den uitslag der bezinkingsnelheid en der complement-bindingsreactie.

In nauw verband met den invloed der sera met verhoogde bezinkingsnelheid staat de uitwerking der graviditeit op den uitslag der reactie. In de graviditeit en in het puerperium treedt immers eveneens een verhoogde serumlabiliteit op. COGGI en GROPPALI²⁶⁷⁾ hebben daarom 200 gevallen onderzocht met het antigeen van W. K. en K., zoowel om den invloed der zwangerschap te onderzoeken, als om de specificiteit der methode te toetsen. Zij vonden bij 103 normale zwangeren 6 positieve reacties (5.8%); bij actieve tuberculose in graviditeit en puerperium op 18 gevallen: 16 positief (88.8%); bij actieve tuberculose: 20 positief op 22 gevallen (91%). We kunnen op grond van deze cijfers dus in het algemeen zeggen, dat de graviditeit de reactie van W. K. en K. niet in onspecifieken zin beïnvloedt.

Ik onderzocht 5 gravidæ, waarvan 2 met actieve longtuberculose en 3 met een colipyelitis. De twee met tuberculose reageerden positief, van de drie met pyelitis: 1 positief, 2 negatief.

ALGEMEENE BESPREKING NAAR AANLEIDING DER RESULTATEN.

Thans dienen nog enkele onderwerpen besproken te worden, die in de litteratuur steeds de aandacht hebben, omdat ze nauw samenhangen met het al- of niet vinden van tuberculose-antilichamen. Beide toestanden, die ik nu aan de hand van cijfers zal bespreken, heb ik reeds eerder aangeroerd bij de behandeling der oorzaken van het vinden van negatieve reacties, bij gevallen, waar toch zeker tuberculose bestaat. In de eerste plaats komen dan de gevallen, die ongeveer verkeerden in het stadium, dat RANKE noemde: „stadium der secundaire allergie”, waarbij we te maken hebben met: generalisatie, weefselovergevoeligheid en klinische labiliteit⁹⁰⁾. Vele onderzoekers o.a. LOBEN en GLAUM, KLINGENSTEIN, ERNST en HORSTER zijn het er over eens, dat in dergelijke gevallen vaak negatieve reacties voorkomen.

Ik vond bij mijn gevallen 20, bij wie men het bestaan van dit stadium moest aannemen. Hiervan reageerden slechts 5 positief = 25%, dus aanzienlijk minder dan bij de caverneuze longtuberculose. Bij de

meening van de genoemde schrijvers kan ik me dus aansluiten, al is het aantal gevallen te klein voor een besliste conclusie.

In de tweede plaats komen de gevallen, die negatief reageeren, omdat de antilichamen uit het bloed zijn verdwenen ten gevolge van den slechten toestand van den patient. Vele schrijvers spreken in dergelijke omstandigheden van „cachexiereacties”, die vooral in de laatste weken vóór den dood op zouden treden. KLINGENSTEIN vond echter in enkele gevallen zelfs na den dood nog een positieve serumreactie.

Bij mijn onderzoek bestond bij 2 patienten met tuberculose, die 1 à 2 weken na het onderzoek aan hun ziekte stierven, een positieve reactie bij de één, een negatieve bij den ander. Het is dus zeker niet geheel waar, dat in extremis de antilichamen steeds uit het bloed verdwijnen.

Ik heb ook nagegaan, hoe de antilichamen zich gedragen bij sterk progrediente gevallen, waarbij echter nog niet van een eindtoestand gesproken kon worden. Hiervan onderzocht ik 28 gevallen, waarvan 15 positief reageerden = 53.6%. Dit percentage komt dus overeen met dat van de positieve reacties op het totale aantal. Het lijkt mij dan ook niet mogelijk, om van een neiging tot negatief worden der reactie te spreken bij snelle verergering van het tuberculeuze proces.

DUURZAAMHEID DER ANTILICHAMEN.

Bij het toepassen van serologische reacties voor de diagnostiek kan het voorkomen, dat men gedwongen is, de te onderzoeken sera eenigen tijd te bewaren. Vindt men dan bij het onderzoek een negatieven uitslag, dan is men geneigd deze mede toe te schrijven aan het verdwijnen der antilichamen door het lange staan. Om den invloed hiervan te onderzoeken, heb ik drie sterk positieve sera gedurende 2 weken in de ijskast bewaard. Daarna waren ze nog even sterk positief. Gedurende minstens 2 weken kan men een dergelijk serum dus bij 0° bewaren. Dit stemt overeen met de ervaring van AUGUSTE²⁶⁸), die den invloed van het verouderen der sera naging, waarbij bleek, dat het aantal positieve resultaten en de intensiteit der reacties toe bleek te nemen. Hoewel werd waargenomen, dat sommige sera van negatief in positief veranderden, bleef toch de specificiteit bewaard.

BESCHRIJVING VAN EENIGE BELANGRIJKE GEVALLEN.

Gezien het geringe aantal onspecifieke reacties zou de reactie van W. K. en K. met succes te gebruiken kunnen zijn, om bij positieven

uitslag met vrij groote zekerheid tuberculose te diagnosticeeren. Een dergelijk gebruik kan men van de reactie maken, door, zooals we dat in de Groningsche interne kliniek hebben gedaan, bij alle ingekomen patienten dit onderzoek te verrichten. Enkele der meest treffende gevallen zal ik mededeelen:

1. *Patient T. m. 51 jaar.*

Opname wegens ernstige diabetes mellitus en beginnend gangraen aan de teenen van beide voeten; retinitis diabetica; klinisch geen verschijnselen van tuberculose; hoest niet. Ureumgehalte van het bloed: 500 mg. per L. PIRQUET: positief; leucocyten: 8200; 14% staafk.; 18% lymphoc.; W. K. en K. positief, WASSERMANN negatief. Hierop thoraxphoto: uitgebreide infiltratie in de linker long, waarschijnlijk tuberculose. 2 Weken later exitus letalis. Obductie: Pleuraschwarte om geheele linker long. Topfibrose met een kleine caverne.

2. *Patient B. m. 53 jaar, katoenwever.*

Hoest sedert 1½ jaar, gaf niets op, nooit contact met tuberculoselidder gehad. Thoraxphoto: dubbelzijdige infiltratie, vooral van beide hili uitgaande, gelijkend op het beeld der uitgesproken pneumokoniose. Bezinking: 29 mM. (WESTERGREN). Bloed: 14% staafk.; 23% lymphoc.; W. K. en K. positief; WASSERMANN negatief; PIRQUET zwak positief. Volgens het oordeel van Dr TIJDENS, leider van het Districtsconsultatiebureau voor tuberculosebestrijding te Groningen, was de photo kenmerkend voor het z.g.n. „infective type” ²⁶⁹⁾ van de pneumokoniose, dus voor een gelijktijdige infectie met tuberculose. M.i. pleit de positieve W. K. en K. hier eveneens zeer sterk in deze richting. Deze meening wordt gesteund door de uitkomsten van een onderzoek van HERMANN KUHN ²⁷⁰⁾, die bij 20 gevallen van steenstoflong zonder tuberculose éénmaal een positieve reactie vond, bij 7 gevallen van pneumokoniose, gecompliceerd door longtuberculose, steeds een positieve reactie (W. K. en K.).

Ook in de volgende gevallen was de W. K. en K. een steun voor de diagnose:

Patiente K. vr. 42 jaar.

Enorme ascites. Geen longafwijkingen. PIRQUET positief. Bezinking 29 mM. Leuc. 3600: staafk. 6%; lymphoc. 40%. WASSERMANN negatief, W. K. en K. positief. Het geheele beloop rechtvaardigde de diagnose: peritonitis tuberculosa.

Patiënte G. vr. 38 jaar.

Voor 2 jaar ziek geworden. Vermagerd. Familie: veel t.b.c. Thorax: geen afwijkingen. Abdomen: geen tumoren, geen vrij vocht. Overal drukpijnlijk en défense. Bezinking: 11 mM. PIRQUET sterk positief.

Bloed: staafk. 23%; lymphoc. 43%. WASSERMANN negatief; W. K. en K. positief. Na langdurige hoogtezondestraling verbetering. Diagnose: peritonitis tuberculosa.

Patiënte M. vr.

Sedert een jaar ziek. Enorme ascites, geen longafwijkingen. L. 8200; staafk. 20%; lymphoc. 19%. Bezinking: 69! WASSERMANN: negatief; W. K. en K. positief. Uit het geheele beloop blijkt, dat we te doen hebben met een tuberculeuze peritonitis.

Patiënt H. m. 40 jaar.

Sedert enkele maanden hoest, kortademigheid. Pleuritisch exsudaat. Geen tuberkelbacillen aantoonbaar in sputum en exsudaat. Bezinking: 34 mM. Staafk. 14%; lymph. 34%. Pleurapunctaat: sereus vocht, polynucleaire cellen. W. K. en K. negatief in bloedserum en exsudaat. De diagnose moest bij dezen man van 40 jaar op longtumor gesteld worden, hetgeen het beloop heeft bevestigd.

Patiënt V. m. 21 jaar.

Infiltratie van de rechter onderkwab. Nooit tuberkelbacillen gevonden. PIRQUET negatief; MANTOUX positief. Bloed: Staafk. $8\frac{1}{2}\%$; Lymphoc. 12%. Bezinking: 119 mM.; W. K. en K. positief. Het verdere beloop maakt de diagnose tuberculose nagenoeg zeker.

Patiënt G. m.

Geïsoleerd rond infiltraat in rechter bovenkwab. Sputum: negatief. PIRQUET: sterk positief. Staafk. 11%. Lymph. 19%. Bezinking: 35 mM.; W. K. en K. positief. Het verdere beloop toont aan, dat we met tuberculose te maken hebben.

Patiënte V.-O. vr.

Cirrhotisch proces van beide bovenkwabben. Kringvormige schaduwen: caverne's? Geen sputum. PIRQUET eerst negatief, later positief. Staafk. 5%; Lymphoc. 38%. Bezinking: 40 mM. W. K. en K. positief. Het geheele beloop is verder kenmerkend voor tuberculose.

Patiënte J. vr.

Beiderzijds uitgebreide röntgenologische afwijkingen. PIRQUET negatief; MANTOUX positief. Sputum negatief. (Vroeger positief geweest). Staafk. 12%. Lymphoc. 17%. Bezinking: 10 mM. WASSERMANN negatief, W. K. en K. positief. Deze uitslag der reactie komt geheel overeen met het klinisch beloop en bevestigt dus de vermoedelijke diagnose.

Patiënte v. K. vr.

Duidelijke longafwijkingen op de photo en bij onderzoek. Vroeger positief sputum, in het sanatorium steeds negatief. Eigenaardige ovale blazige vormsels in het sputum, onbekend van welken aard. Staafk. 11%. Lymph. 30%. Bezinking 11 mM. PIRQUET sterk positief, W. K. en K. positief. Hoewel het sputum thans negatief is, wijst de complementbindingsreactie toch ook op de diagnose: tuberculose.

Patient Sch. m. 48 jaar.

Opgenomen met groot pleuraexsudaat links: iets bloederig vocht met polynucleairen en lymphocyten, geen tumorcellen, geen bacillen. PIRQUET sterk positief; sputum, iets etterig, geen bacillen. W. K. en K. negatief, WASSERMANN negatief, ook W. K. en K. in het exsudaat negatief. Exitus letalis; obductie: klein primair longcarcinoom in de linker onderkwab.

Patient v. D. m.

Groot infiltraat in rechter long; sputum: negatief. Leuc. 13.200. Geen linksverschuiving. Bezinking 54 mM. WASSERMANN negatief, W. K. en K. negatief. Diagnose: longtumor.

Het spreekt vanzelf, dat ik dit lijstje nog met vele gevallen zou kunnen uitbreiden, maar dat zou te ver voeren. Bovendien was het alleen mijn bedoeling, om eenige van die gevallen te beschrijven, waar de reactie werkelijk een belangrijke steun voor de diagnose is geweest.

EINDOORDEEL

Wanneer we tenslotte nog eens nagaan, welke waarde we moeten toekennen aan de complementbindingsreactie op tuberculose, uitgevoerd volgens WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN, dan lijkt het mij geheel verantwoord, deze waarde gering te noemen. Het

moet erkend worden, dat de reactie ons in enkele gevallen op het spoor bracht van een bestaande tuberculose, dat in meerdere gevallen de positieve uitslag der reactie een belangrijke steun was voor de diagnose, dat omgekeerd een negatieve uitslag enkele malen een tuberculose kon helpen uitsluiten. Het feit echter, dat bij 46.7% der met zekerheid als tuberculose gediagnosticeerde gevallen de reactie negatief was, doet zeer veel afbreuk aan de waarde voor de diagnostiek.

Een belangrijk feit is echter weer, dat slechts bij 5.2% der gezonden en niet-tuberculosepatienten positieve reacties voorkwamen. Hierdoor zijn wij bij het vinden van een positieve reactie met vrij groote zekerheid in staat, de diagnose tuberculose te stellen. Deze mogelijkheid wordt nog grooter, als we op grond der gegevens uit de litteratuur en op grond van onze eigen ervaring, uitsluiten: malaria, diphtherie en lepra, en de sera van patienten met een verhoogd gehalte aan galzure zouten in het bloed, en ook de positieve reacties in sera, waarvan we kunnen verwachten, dat ze colloïdchemisch sterk veranderd zijn, met voorzichtigheid beschouwen. Daardoor daalt het percentage onspecifieke reacties tot 2.9%.

Steeds zal men de overige gegevens van het onderzoek den doorslag moeten laten geven en men kan aan de reactie alleen deze waarde toekennen, dat ze aan het verdere onderzoek een bepaalde richting kan geven.

EXSUDATEN.

Zooals ik in de inleiding van dit proefschrift reeds medegedeeld heb, is de eigenlijke aanleiding voor mijn onderzoekingen te vinden in het artikel van HABS en WITEBSKY in de *Klin. Woch.* van 16 December 1933: „Die Bedeutung der Kombination bakteriologischer und serologischer Methoden für die Untersuchung von Punktaten”.

Zij beschrijven hierin voornamelijk hun ervaringen bij het onderzoek der punctaten op tuberculose en wijden ook nog een gedeelte aan het onderzoek op gonorrhoe. Daar dit laatste hier niet ter zake is, zal ik alleen in het kort weergeven, wat op de tuberculose betrekking heeft.

HABS en WITEBSKY onderzochten in den loop van 1932 en 1933 in het geheel 150 punctaten van verschillenden aard, die naar het laboratorium werden gezonden door de Universiteitsklinieken, een sanatorium voor tuberculose en door medici uit de praktijk. Ze zochten in de eerste plaats intensief microscopisch naar tuberkelbacillen, in aansluiting daaraan werden kweekproeven gedaan (voedingsbodems van HOHN en LÖWENSTEIN) en eventueel caviaproeven. Het zij nog vermeld, dat zij de caviaproeven belangrijker achten dan de kweekproeven. Bij 14 microscopisch negatieve punctaten werden in 4 gevallen tuberkelbacillen aangetoond door cultuur en door caviaproef, in 9 gevallen was alleen de dierproef positief, de cultuur negatief, 1 maal de dierproef negatief, de cultuur positief. Beide methoden lijden echter aan het euvel, dat het lang duurt voor men resultaat ziet, zoodat een goede serologische methode zeer gewenscht zou zijn. De serodiagnostiek op tuberculose werd uitgevoerd volgens de origineele methode van WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN, dus de reactie werd ook o.a. pas positief genoemd bij volledige remming in minstens 2 buisjes.

De uitkomsten van het onderzoek der pleurapunctaten met de complementbindingsreactie waren de volgende: 15 pleurapunctaten van patienten met klinische tuberculose: 11 positief. Bij 7 hiervan waren ook tuberkelbacillen aantoonbaar, bij 4 werd dus de diagnose alleen door de positieve complementbindingsreactie mogelijk.

18 punctaten van een zgn. „primaire” tuberculeuze pleuritis. In 5 punctaten werden tuberkelbacillen aangetoond. Van deze 18 reageerden 10 punctaten positief en 8 negatief.

Ook kan men de resultaten zóó indeelen, dat men zegt, dat in 8 gevallen alleen de serologische reactie den tuberculeuzen aard aantoonde, omdat in deze gevallen geen tuberkelbacillen te vinden waren, terwijl slechts in 3 gevallen de serologische reactie negatief uitviel, bij een positief bacteriologisch resultaat.

De schrijvers wijzen er dan ook met nadruk op, dat men — waarop de titel van hun artikel reeds duidt — het bacteriologische onderzoek met het serologische moet combineeren. In ieder geval blijkt ten duidelijkste, dat het serologische onderzoek van groote waarde kan zijn. De waarde der serologische reactie volgens W. K. en K. in het punctaat wordt nog hierdoor versterkt, dat in enkele gevallen bij het onderzoek van bloedserum en punctaat van denzelfden patient, werd gevonden, dat het punctaat positief reageerde, het bloedserum echter negatief. Dit was het geval bij 4 patienten, terwijl bij 37 andere, op gelijke wijze onderzochte patienten, de reacties in bloedserum en punctaat gelijk waren.

Een belangrijk punt was verder, dat bij de als contróle's te beschouwen punctaten van pleuritiden door andere bacterieële infecties, door carcinoom en van transsudaten, in het geheel 25 punctaten, slechts éénmaal een positieve tuberculosereactie werd gevonden, waarbij in het punctaat op geen enkele wijze tuberkelbacillen konden worden aangetoond. De schrijvers achten een fout niet onmogelijk, daar deze positieve reactie verkregen werd, toen ze nog weinig ervaring hadden en ze later nooit weer iets dergelijks hebben waargenomen. Er was dus één onspecifieke reactie op 25 gevallen. Deze groote specificiteit wijst er reeds op, dat de reactie van W. K. en K. hierbij van waarde moet zijn.

Verder onderzochten HABS en WITEBSKY nog 14 buikpunctaten van patienten met ascites door levercirrhose of carcinoom, die allen negatief uitvielen.

Er werden 40 gewrichtspunctaten onderzocht. In 6 gevallen konden tuberkelbacillen aangetoond worden, waarvan bij 4 de tuberculose-complementbindingsreactie positief was, terwijl in 1 geval de W. K. en K. positief was, zonder dat bacillen aangetoond konden worden.

Ook werd het onderzoek uitgestrekt tot koude abscessen. In 8 gevallen 3 positieve reacties. Steeds waren er ook bacillen aan te toonen.

De schrijvers wijzen in verband met dit onderzoek op eenige waarnemingen, die ook voor mijn onderzoek van belang zijn en die ik hier daarom wil vermelden: „Het gelijktijdig vinden van tuberkelbacillen en antilichamen in hetzelfde punctaat, bewijst, dat de antilichamen het aantoonen van tuberkelbacillen niet bemoeilijken”. Dit kan men

inderdaad zeggen van de pleuritiden, opgetreden bij klinisch vaststaande tuberculose, daar in alle waargenomen gevallen van serologische positiviteit tuberkelbacillen konden worden aangetoond. De schrijvers letten bij deze uitspraak echter niet op de uitkomsten bij 8 gevallen van primaire tuberculeuze pleuritis met positieve W. K. en K. en negatief bacteriologisch onderzoek. Hierbij is het toch onmogelijk om bovenaangehaalde uitspraak vol te houden.

De exsudaten, die optraden tijdens een pneumothorax-behandeling en die de schrijvers noemen „Reizexsudate”, gaven een positieve reactie bij negatief bacteriologisch onderzoek.

De opmerkingen over een negatieven uitslag in het z.g.n. „generalisatiestadium” berusten op te weinig gevallen, om er nader op in te gaan.

Bij 2 exsudaten werd de reactie in het pleuravocht herhaaldelijk uitgevoerd, waarbij ze na eenigen tijd van negatief in positief overging, ongeveer een maand na het begin der ziekte. Daarom is herhaling van het onderzoek zoo belangrijk.

Zooals reeds meegedeeld is, werd in 4 gevallen het punctaat positief, het bloed daarentegen negatief gevonden. Bij één hiervan, een primaire tuberculeuze pleuritis, reageerde het bloedserum later positief. Het punctaat was dus eerder positief dan het bloed. Misschien zou dit kunnen wijzen op een meening, die vroeger vaak besproken is, dat bij de tuberculeuze pleuritis plaatselijk antilichamen worden gevormd.

Wanneer we thans overgaan tot een bespreking van de onderzoekingen, die op dit gebied reeds verricht zijn, moeten we het eerst vermelden een publicatie, die het verslag behelst van een voordracht van COURMONT ²⁷¹) op het tuberculosecongres te Parijs in Juli en Aug. 1898. Hij trachtte de agglutineerende kracht van het exsudaat aan te toonen, evenals ARLOING die had aangetoond in het serum. Hij vond, dat niet-tuberculeuze exsudaten geen tuberkelbacillen konden agglutineeren, tuberculeuze wel. Ook constateerde hij reeds, dat de agglutineerende kracht van het exsudaat sterker was dan die van het serum van denzelfden patient. Op 11 tuberculeuze exsudaten 10 positieve reacties, op 6 niet-tuberculeuze één positieve. Ascitesvocht: 5 exsudaten van tuberculeuze peritonitis waren allen positief. 7 punctaten van ascites door levercirrhose: allen negatief. Lumbaalvocht van 33 tuberculosepatienten: 25 hiervan positief! Deze uitkomsten zijn opvallend gunstig. Geen der volgende onderzoekingen had een zoo gunstig resultaat.

BRUCK ²⁷²) heeft zich in 1906 beziggehouden met het aantonen van bacillaire producten in tuberculeuze exsudaten met behulp van de complementbindingsreactie.

De Berl. Klin. Woch. van 1907 bevat een mededeeling van CITRON²⁷³), die in het bloedserum en in het exsudaat van een tuberculosepatient in overvloed antilichamen vond, gericht tegen Alttuberkulin als antigeen.

In 1908 heeft MEYER²⁷⁴) in exsudaten van lijken substanties der tuberkelbacillen trachten aan te toonen met agglutinatieproeven, hetgeen een mislukking werd, waarvoor hij ingenieuze verklaringen meent aan te kunnen voeren.

Het volgende jaar verschijnt een publicatie van SLATINÉANU en DANIELOPOLU²⁷⁵), die bij 6 gevallen van serofibrineuze pleuritis bij tuberculose, in het exsudaat in 4 gevallen positieve complement-binding vonden, 2 maal in het exsudaat positief en in het bloedserum negatief. Tuberculeuze peritonitis gaf in het buikvocht in twee onderzochte gevallen steeds een positieve reactie, éénmaal ook in het serum.

LIVIERATO en CROSSONINI²⁷⁶) hebben een uitgebreid onderzoek ingesteld naar de serologische eigenschappen van tuberculeuze exsudaten en vonden antitoxinen en agglutininen in de helft der gevallen, zelden praecipitinen, iets vaker complementbindende antilichamen.

In 1911 moet nog een publicatie vermeld worden van PARASKEROPOULOS²⁷⁷). Deze gebruikte de bepaling van de z.g.n. opsonische index volgens WRIGHT, om in het vocht van acute pleuritische exsudaten antilichamen tegen tuberkelbacillen aan te toonen. Niet alleen, dat dit hem met deze techniek gelukte, doch hij kon ook constateeren, dat de exsudaten een hoogere concentratie aan antilichamen bevatten, dan het serum van denzelfden patient. Hij stelt daarom voor, om de antilichamen dezer exsudaten voor de behandeling der tuberculose te gebruiken, na de tuberkelbacillen er uit verwijderd te hebben. Voor zoover mij bekend is, is deze behandeling nooit ernstig toegepast.

Gedurende vele jaren blijken er op dit gebied daarna geen onderzoekingen verricht te zijn. Pas in 1921 zien verschillende publicaties van Fransche zijde het licht, zonder twijfel door de bemoedigende resultaten, die met het tuberculose-antigeen van BESREDKA werden verkregen.

COURCOUX²⁷⁸) onderzocht met de complementbindingsreactie met dit antigeen en met dat van BOQUET en NÈGRE een vrij groot aantal gevallen. Iedere patient werd drie- à viermaal onderzocht, met een week tusschenruimte. Vaak werd de reactie later positief, als ze in het begin negatief was. Bloedserum en exsudaat werden steeds tegelijkertijd onderzocht. In het algemeen verliepen de reacties

parallel. Eenige keeren werd de reactie in het exsudaat later positief dan in het serum. 21 gevallen met een pleuritisch exsudaat werden onderzocht. Hiervan waren 17 in ontwikkeling, onder deze 17 reageerden 11 positief (2 pas na eenigen tijd), 6 negatief. 4 sera werden eenige weken of maanden na resorptie van het exsudaat onderzocht: 1 positief, 3 negatief. De antigenen gaven beide gelijke resultaten. De schrijver maakt een zeer belangrijke gevolgtrekking uit zijn resultaten. Hij vond namelijk, dat de positieve reacties voorkwamen bij patienten, bij wie het pleuritische exsudaat gecompliceerd werd door een tuberculose van de long. Daarom zegt hij: „een positieve complementbindingsreactie op tuberculose bij een pleuritisch exsudaat wijst op een longproces”. Afgezien van het feit, dat we bij bijna iedere pleuritis van tuberculeuzen aard een, althans geringe, longaandoening aan moeten nemen, is toch deze conclusie in zooverre belangrijk, dat dus in gevallen met positieve reactie de aandoening ernstiger is, dan in de gevallen met een negatieve reactie.

In 1922 vinden we een mededeeling van OGAWA²⁷⁹⁾, die 12 pleuritische exsudaten van tuberculeuzen aard onderzocht. Hij gebruikte het antigeen van PÉTROFF en vond met de complementbindingsreactie met dit antigeen elf maal een duidelijk positieve reactie, van 5 exsudaten van anderen aard vond hij éénmaal een positieve reactie en wel bij een lueticus. Naast deze onderzoekingen deed hij dierproeven met konijnen en caviae. Als hij de opgewekte pleuritische tuberculeuze exsudaten na 15 dagen puncteerde, vond hij in 89% een sterke reactie. In het bloed vond hij terzelfdertijd een negatieve reactie. Hij concludeert: „Specifieke antilichamen kunnen dus vaak aangetoond worden in exsudaten, die ontstaan zijn door locale infectie, op een tijdstip, dat ze in het serum niet aantoonbaar zijn (vermoedelijk door te sterke verdunning)”.

KWASNIEWSKI en CIRIC²⁸⁰⁾ onderzochten met het antigeen van BESREDKA 4 tuberculeuze exsudaten, die allen positief reageerden, en wel sterker positief dan het serum. 2 transsudaten en 2 post-pneumonische empyemen waren negatief.

KATZ en RABINOWITCH-KEMPNER²⁸¹⁾ vonden op 37 punctaten de complementbindingsreactie volgens BESREDKA steeds positief in die exsudaten, waarin tuberkelbacillen konden worden aangetoond. Strepto- en pneumococcen-exsudaten gaven steeds een negatieve reactie.

In de reeds eerder genoemde dissertatie van BOUVIER¹³⁹⁾, die in 1923 over de serologische reacties bij tuberculose schreef, spreekt hij wel over serumreacties bij tuberculeuze pleuritiden, doch hij heeft

geen reacties met het exsudaat uitgevoerd. In één geval van een peritonitis, verdacht voor tuberculose, vond hij de complement-bindingsreactie positief in het buikvocht.

Met het toen sinds kort in gebruik gekomen antigeen van WASSERMANN onderzochten KLEMPERER en SALOMON²⁸²⁾ 4 tuberculeuze exsudaten, waarvan 3 positief reageerden, 2 postpneumonische empyemen en een stuwingstranssudaat bij luetische aortainsufficiëntie gaven echter ook een positieve reactie.

Onze landgenoot HERMAN VOS²³⁸⁾ heeft bij zijn onderzoek naar de waarde der tuberculosereactie van WASSERMANN o.a. ook 12 gevallen van tuberculeuze pleuritische exsudaten onderzocht:

In 3: serum positief, exsudaat negatief.

„ 5: „ negatief, „ „

„ 4: „ „ „ positief.

5 niet-tuberculeuze exsudaten reageerden negatief.

Hoewel het oordeel van dezen onderzoeker over de reactie niet gunstig luidt, zijn toch de 4 exsudaten, die positief reageeren bij een negatief serum, opmerkelijk, daar ook COURCOUX (zie boven) eenige keeren deze waarneming deed.

SALOMON en VALTIS²⁸³⁾ komen bij hun onderzoek van bloed en pleuravocht bij tuberculeuze exsudaten tot belangrijke conclusies, die overeenkomen met de hedendaagsche bevindingen. Zij onderzochten de antilichamen en het antigeen in bloed en pleuravocht bij patienten met primaire pleuritis exsudativa en met pneumothorax-exsudaten. Ze vonden, dat de exsudaten, die de pneumothorax compliceeren en de pleuritis exsudativa dezelfde hoeveelheid antilichamen hebben als het serum. Het merkwaardige is, dat in de pneumothoraxexsudaten op één na, evenveel antigeen was aan te toonen als in het serum, terwijl in de primaire pleuritische exsudaten geen antigeen vermogen was aan te toonen. Van 5 pleuritische exsudaten waren 3 positief met de reactie op antilichamen. Het voorkomen van antigeen in de pneumothoraxexsudaten beteekent m.i., dat deze exsudaten dus niet z.g.n. „Reizexsudate” geweest zijn, doch zeer waarschijnlijk echte ontstekingsexsudaten door een tuberculeuze pleura-aandoening.

HOROWITZ-WLASSOWA²⁸⁴⁾ vermeldt slechts 1 geval van exsudatieve pleuritis, waarvan het pleuravocht met BESREDKA's antigeen positief reageerde.

Een zeer belangrijke bijdrage tot de kennis van deze onderzoeksmethoden van pleuritische exsudaten is geleverd door MICHAILOW²⁸⁵⁾, die met het antigeen van BESREDKA 40 punctaten onderzocht. Hij

vond op 25 tuberculeuze pleurapunctaten de reactie 18 keer positief, terwijl in lang niet al deze gevallen tuberkelbacillen, direct of na kweekproeven, waren aan te toonen.

Verder onderzocht hij 13 pneumothoraxexsudaten, waarvan 12 positief reageerden en 12 andere tuberculeuze pleuritiden: 6 hiervan waren primaire exsudaten: 3 positief, 6 secundaire: 5 positief. Exsudaten van anderen aard, waarvan 13 werden onderzocht (4 post-pneumonische empyemen, 4 niet-tuberculeuze pleuritiden, 3 transsudaten, 1 polyserositis, 1 carcinomateuze pleuritis), reageerden allen negatief, evenals een punctaat van een tuberculeuze knie en van een tuberculeuze ascites. Zijn beschouwingen over de diagnostiek der exsudaten in het algemeen zijn zeer de moeite waard, ook omdat hij zeer aannemelijk maakt, dat een nieuw betrouwbaar diagnosticum zeer welkom zal zijn. Eén onzer belangrijkste middelen voor de diagnostiek is hierbij immers het onderzoek van het sediment. MICHAÏLOW zegt nu zeer terecht in hoofdzaak het volgende: het karakter van den celinhoud van het exsudaat hangt af van de intensiteit en de snelheid van inwerking van den ontstekingsprikkel. Polynucleaire leucocyten lijken vaak op lymphocyten door zwelling van het cellichaam, vacuolevorming en schrompeling der kernsegmenten met eventueel optredende geheele of gedeeltelijke destructie van het protoplasma. De kernresten worden dan gemakkelijk voor lymphocyten gehouden. In tuberculeuze exsudaten overheerschen in de eerste dagen de polynucleairen, later de lymphocyten (en gedegenerende polynucleairen). De schrijver gaat zelfs zoover te beweren, dat het cytologische beeld als zoodanig niets over den aard van het exsudaat zegt, alleen iets over intensiteit en duur der ontsteking. Op deze wijze kan men uit het vinden van een overwegend aantal lymphocyten in het exsudaat afleiden, dat tuberculose de oorzaak zou kunnen zijn.

VEBER ²⁸⁶⁾ stelde een nauwkeurig onderzoek in naar de reactie in pleuritisch vocht met het antigeen van BOQUET en NÈGRE. In de eerste plaats titreerde hij de antilichamen in het serum vóór en gedurende het bestaan van de pneumothorax en op het moment van het optreden van een exsudaat (5 patienten). Hij vond in het serum een vermeerdering van antilichamen gedurende de verergering, die de vochtvorming voorafgaat, vermindering bij verbetering van den toestand. In de tweede plaats titreerde hij de antilichamen in het ontstane pleuravocht. Het vocht in de pleura bevatte vanaf het moment van optreden evenveel antilichamen als het serum. Het gehalte blijft ook na langen tijd even hoog in vocht en serum.

Daar deze pneumothoraxexsudaten in overvloed tuberkelbacillen

bevatten of filtreerbare vormen ervan, benevens een antigeen, dat complement bond met antituberculoseserum, meent de schrijver, dat de plotselinge toeneming van serumantilichamen op het oogenblik van de vochtvorming ontstaat door de resorptie van het tuberculose-antigeen uit het pleuravocht door de pleura. Hoewel deze verklaring, die interessant doch niet bewezen is, ons geen oplossing van het vraagstuk der schommelingen in het gehalte aan antilichamen aan de hand doet, geeft ze toch een aanduiding, waar de oorzaak hiervoor wellicht gezocht kan worden.

Pleuraexsudaten van tuberculoselijders in zeer goeden toestand, bij wie in het serum geen antilichamen aantoonbaar waren, gaven een negatieve reactie.

Ook in de latere jaren hebben verschillende onderzoekers zich met het onderzoek van pleuritische exsudaten bezig gehouden, zij het dan ook vaak terloops.

KARWACKI, GROER en KRAKOWSKA ²⁸⁷⁾ verrichtten hun onderzoekingen in 28 pleuraexsudaten met antigenen uit verschillende stammen van tuberkelbacillen. Hoofdzaak was hierbij het onderzoek naar het bestaan van verschillende stammen van tuberkelbacillen. 2 exsudaten waren onbruikbaar wegens sterke anticomplementaire werking, één van een geval van polyserositis gaf een negatieve reactie, evenals één van een carcinomateuze pleuritis; 24 tuberculeuze exsudaten gaven positieve reacties met één of meerdere antigenen.

MARTA STAMM ²⁸⁸⁾ heeft bij 2 tuberculeuze exsudaten der pleuraholte de reactie sterk positief gevonden (antigeen BESREDKA).

Een ervaren kenner van het serologisch onderzoek der tuberculose en van de chemie der tuberkelbacillen DOAN ²⁸⁹⁾ heeft de quaestie op een geheel oorspronkelijke wijze aangepakt. Hij gebruikte als antigeen de fosfatidefractie, door ANDERSON uit de tuberkelbacillen geïsoleerd, verder een antiserum, verkregen door konijnen met de fosfatidefractie te behandelen, welke fractie immers een zeer krachtig antigeen is. De reactie werd uitgevoerd als praecipitatie-reactie. Er werden 134 patienten onderzocht (serum, lumbaalvocht, pleuraexsudaat, ascitesvocht, gewrichtsvocht). 14 tuberculeuze pleura-exsudaten reageerden sterk positief. Titerbepalingen zijn echter wel noodig, daar ook normaal serum een geringe reactie geeft. Het aantoonen van antigeen met behulp van genoemd anti-fosfatide-konijnenserum noemt deze schrijver de gevoeligste proef in vroege gevallen en in gevallen waarin het lichaam niet meer op aanwezigheid der bacillen reageert.

DOAN gebruikt dus dat gedeelte van den tuberkelbacil, dat de

sterkste antigene werking heeft. Dat hiertegen inderdaad antilichamen in serum en exsudaten voorkomen, bewees hij door absorptieproeven met hetzelfde phosphatide. Na absorptie was de praecipitatiereactie negatief. Deze methode, indien zij betrouwbaar blijkt te zijn, verdient groote belangstelling. Duncan slaat haar hoog aan ¹⁷⁶⁾

HÖRING ²⁴⁵⁾ verwacht van het onderzoek van de pleuritische exsudaten weinig, daar hij bij 30 gevallen steeds een negatieve reactie in het serum vond en ook in het exsudaat, zelfs bij positieve caviaproef. Pneumothoraxexsudaten reageerden echter meestal sterk positief. Hij onderzocht hiervan 13, waarvan slechts 2 negatief waren. Van deze beide bestond het eene reeds 3 jaar, het andere was van een patient die in zeer slechten toestand was.

PINNER en MOERKE ²⁹⁰⁾ gaan in hun uitgebreide artikel over pleuritische exsudaten slechts terloops in op het serologische onderzoek. De reden hiervoor is, dat ze in verscheidene exsudaten wél een positieve reactie waarnamen, doch niet frequenter dan in het bloedserum.

Uit den allerlaatsten tijd moet het onderzoek van SCHLESMANN ²⁹¹⁾ worden genoemd, die ook heeft geconstateerd, dat bij het optreden van een positieve reactie, dit het eerst in het exsudaat plaats heeft en daarna in het bloedserum. Hij onderzocht met de methode en het antigeen van W. K. en K., 11 exsudaten: 7 positief.

Het blijkt uit deze literatuuraanhalingen dus wel, dat vele onderzoekers eenige aandacht hebben gegeven aan het serologisch onderzoek der exsudaten. De meesten hebben zich echter bepaald tot enkele, die hun in handen vielen, doch weinigen hebben er een stelselmatig onderzoek naar ingesteld. Zoo wijdt zelfs een schrijver als J. A. FREDERIKSEN ²⁹²⁾ die in de Erg. der ges. Tuberk. forschung Bd. VI. (1934) een hoofdstuk heeft geschreven, getiteld: „Studien über Pleuritis exsudativa”, aan het serologisch onderzoek van het exsudaat slechts één bladzijde en komt hierin tot een volkomen afwijzend standpunt. Weliswaar gebruikte hij antigenen, die op ongewone wijze samengesteld waren: n.l. 6 verschillende, gedeeltelijk phosphaat-gedeeltelijk proteïne fracties. De reacties werden uitgevoerd als complementbindingsreacties. In de eerste plaats werd getracht om in serum of exsudaat antilichamen aan te toonen. 16 sera werden onderzocht, waarvan 15 van duidelijke tuberculosegevallen; 6 exsudaten: 3 tuberculeuze pleuraexsudaten, 1 tuberculeuze ascitesvloeistof, 1 tuberculeus cerebrospinaalvocht en één pleuravocht van onbekende aetiologie. *Alle reacties waren negatief.* Daarna werd geprobeerd bij drie zwaar zieke tuberculosepatienten antigeen in het serum aan te

toonen met zeer sterk werkzame konijnenantisera, vervaardigd met de genoemde fracties. *Alle proeven vielen negatief uit.* Ten slotte werden praecipitatiereacties uitgevoerd met antiserum en bloedserum: alles negatief.

In het bovenstaande wordt dus feitelijk door FREDERIKSEN alleen een kort overzicht gegeven van mislukte proeven met een nieuw antigeen. Over andere reacties met één der meer bekende antigenen rept hij zelfs niet. Deze totale negatie van dit gedeelte van het onderzoek is bevreemdend en komt niet overeen met de waarde ervan. Uit de bespreking, die FREDERIKSEN in zijn overigens zeer nauwkeurig bewerkt artikel, aan de andere middelen onzer diagnostiek van pleuritische exsudaten wijdt, blijkt ook niet, dat we aan de bestaande hulpmiddelen voldoende hebben. Zoo verklaart hij zelfs op blz. 659 van hetzelfde artikel: „Im groszen und ganzen musz man sagen, dasz die Untersuchung der physikalischen und chemischen Natur des Exsudats uns über die Aetiologie keine Aufklärung geben kann”.

Ook de toepassing van de reactie van WELTMANN in het vocht van pleuritische exsudaten bleek geen succes te zijn. DISSMANN en NASSAU ²⁹³) kunnen althans geen enkel waardevol gegeven aan de reactie ontleenen.

Als we eens nagaan, welke methoden over het algemeen ter beschikking staan, dan komen we tot de volgende opsomming: (het klinische beeld, de mogelijkheden van differentieel-diagnostiek door physisch onderzoek blijven hier geheel buiten beschouwing. Ik noem hier dus alleen dat onderzoek, dat uitgevoerd wordt in het vocht van de lichaamsholten, dat na punctie verkregen wordt).

TRANSSUDAAT OF EXSUDAAT.

Deze onderscheiding is van essentieel belang bij het vinden van een helder, sereus vocht. We kunnen dan onderzoeken:

1. Het eiwitgehalte.

Exsudaten bevatten meer dan 3% eiwit;

Stuwingstranssudaten bevatten minder dan 3% eiwit;

Transsudaten bij algemeen oedeem $\pm$ 0.5%.

Bij transsudaten zijn echter zelfs wel eiwitgehalten gevonden van 6.5%, doch bij waarden hooger dan 3% moet men wel aannemen, dat de weefsels tusschen bloed en transsudaat zwaar beschadigd zijn. Voor klinische toepassing van de bepaling van het eiwitgehalte is de grens van 3% de meest geschikte (naar GERHARTZ ²⁹⁴).

Wat de verdeling der eiwitfracties in het vocht betreft, kan men vaststellen, dat bij de ontstekings-exsudaten het euglobuline relatief vermeerderd is. Dit komt vooral sterk tot uiting bij de vergelijking tusschen pleuritisch exsudaat en het vocht van een hydrothorax. Men kan als oorzaak hiervoor aannemen, dat de ontstoken pleura meer doorlaatbaar is en zoo de grootere globulinemoleculen doorlaat. Daar dus niet alleen albumine in het vocht kan voorkomen, doch ook globulinen (èn fibrinogeen), is de methode van ESBACH (met zijn albuminometer) geen exacte methode ter bepaling van het totaal eiwit. Eenvoudigheidshalve wordt ze toch steeds toegepast: het eiwitgehalte dient niet hooger dan $4\frac{0}{100}$ te zijn (s.g. moet dus lager zijn dan 1007). Dit verkrijgt men, indien noodig, door verdunning der vloeistof met eiwitvrije urine. Deze verdunning wordt later natuurlijk in rekening gebracht. Verder verloopt de proef, zooals ze voor de urine wordt toegepast.

2. Proef van RIVALTA: men laat in 200 cM.³ water, waarin 2 druppels ijsazijn, voorzichtig een druppel van het te onderzoeken vocht vallen, die in het geval van een exsudaat als een sierlijk wolkje naar beneden zakt. Volgens GERHARTZ zou deze reactie berusten op den overgang van para-euglobuline en van het fibrinoglobuline in het vocht der exsudaten. GORTER en DE GRAAF ²⁹⁵⁾ vermoeden, dat het door zeer verdund azijnzuur praecipiteerbaar eiwit stamt van de leucocyten en samenhangt met de hoeveelheid witte bloedcellen in de punctievloeistof, waaruit dan weer volgt, dat de proef van RIVALTA indirect een aanwijzing is voor het aantal leucocyten, dus voor exsudaat of transsudaat.

3. Soortelijk gewicht.

Ook hierdoor is de grens tusschen transsudaat en exsudaat niet scherp te trekken. GORTER en DE GRAAF geven hiervoor een tabel:

S.g.	Benaderd eiwitgehalte.
1018	4%
1015	2.5%
1012	1.5—2%
1010	1.0—1.5%
1008	0.5—1.0%

Hieruit blijkt, dat men het eiwitgehalte uit het soortelijk gewicht kan berekenen, zooals REUSZ ²⁹⁶⁾ heeft aangegeven: $E(\text{eiwitgehalte}) = \frac{3}{8} (\text{s.g.} - 1000) - 2.8$, of met een kleine wijziging door RUNEBERG ²⁹⁶⁾:

men trekt voor vloeistoffen met een s.g. beneden 1014, het getal 2.73 af in plaats van 2.8, en voor vloeistoffen met een s.g. boven 1015, 2.88. Men krijgt, op deze wijze berekend, echter eenigszins andere uitkomsten dan GORTER en DE GRAAF opgeven.

Men mag dus volgens GORTER en DE GRAAF de diagnose: transsudaat stellen bij een s.g. onder 1016 à 1015. FREDERIKSEN stelt als grenswaarde 1012, waar beneden men pas de diagnose transsudaat mag stellen. STAEHELIN zegt, dat waarden tusschen 1012 en 1018 met groote omzichtigheid beschouwd moeten worden. MATTHES²⁹⁷⁾ stelt de diagnose transsudaat bij een s.g. beneden 1015 en eiwitgehalte beneden 1%. GLOYNE²⁹⁸⁾ geeft als grens een s.g. van 1018.

Zoowel het gebruik van het eiwitgehalte als van het s.g. moeten met reserve geschieden, waarop ook REICHE²⁹⁹⁾ nog eens wijst: zelfs bij versche exsudaten kan een gedeelte van het eiwit omgezet zijn. Omgekeerd kan bij lang bestaande exsudaten en transsudaten concentratie optreden door waterresorptie.

4. Aantal cellen.

Bij een transsudaat vindt men een gering aantal cellen, meestal alleen groote gedegeneerde endotheelcellen met enkele lymphocyten.

5. Bij een transsudaat worden geen bacteriën gevonden en de serologische reacties zijn negatief.

Heeft men vastgesteld met een exsudaat te maken te hebben, dan moet dus bepaald worden de

AARD VAN HET EXSUDAAT.

1. Uiterlijk.

Een exsudaat kan zijn: sereus, serofibrineus, purulent, haemorrhagisch en chyleus. Tuberculeuze exsudaten zijn meestal sereus of serofibrineus, van iets geelgroenige kleur, helder, soms haemorrhagisch, zelden purulent.

2. Cytologisch onderzoek.

Polynucleaire leucocyten wijzen in het algemeen op een meer acute aandoening, lymphocyten op een chronische. Endotheelcellen worden nogal eens aangetroffen, terwijl men bij een exsudaat tengevolge van een longtumor in zeer enkele gevallen gezwelcellen kan vinden.

Zoals ik meegedeeld heb, stond MICHAILOW zeer sceptisch tegenover

het gebruik van het cellenbeeld voor de differentieeldiagnostiek. QUENSEL ³⁰⁰⁾ legt bij de bespreking van de differentieering der exsudaten veel gewicht op het vinden van carcinoomcellen, waarvoor hij verschillende z.i. typische kenmerken opgeeft. Verder is hij ook van oordeel, dat het uiterst lastig is, om op grond van de cytologische bevindingen tot een diagnose te komen. GLOYNE geeft bij tuberculeuze exsudaten een overwogen der lymphocyten aan, ook bij de z.g.n. primaire exsudaten. De discussies over den oorsprong der lymphocyten en de moeilijkheden bij de diagnostiek schrijft hij grootendeels toe aan onvoldoende techniek bij het onderzoek (te lang staan van het vocht, te sterk verhitten, te snel centrifugeeren enz.). „It is not impossible for a degenerated or broken endothelial cell or a swollen polymorphonuclear leucocyte to resemble a lymphocyte”.

Ook MATTHES laat zich op blz. 331 in zijn genoemd leerboek zeer voorzichtig uit: overwogen bij een acuut ontstaan en nog niet lang bestaand exsudaat de lymphocyten, dan is het waarschijnlijk van tuberculeuzen aard, want andere exsudaten bevatten in het begin meestal voornamelijk polynucleaire leucocyten. Bij chronische exsudaten kan men differentieel-diagnostisch niets meer uit den vorm der leucocyten besluiten.

FREDERIKSEN hecht meer waarde aan het cytologisch onderzoek en stelde de volgende tabel samen, waaruit blijkt, dat men aan het vinden van een overwegend aantal lymphocyten de beteekenis mag toekennen, dat het waarschijnlijk een tuberculeus exsudaat is:

	Lymphoc.	Leuc. +	Lymph.	Leuc.
	%	%	%	%
tuberculeuze pleuritis	81	0		19
niet-tuberculeuze pleuritis	25	28		49
pleuritis v. onbekenden oorsprong	82	0		18
rheumatoïede pleuritis	60	40		0

3. Bacteriologisch onderzoek.

a. direct onderzoek van het sediment vlg. *Ziehl Neelsen*.

Dit levert slechts in weinige gevallen een positief resultaat, hoewel wij hiermee vaker succes hadden dan andere onderzoekers.

	microsc.	positief.
15 primaire tbc. pleuritis	1	
5 secundaire „ „	2	
2 pneumothoraxexsudaten	1	

Op 22 hierop onderzochte exsudaten vonden we dus 4 maal bij direct onderzoek tuberkelbacillen, terwijl het FREDERIKSEN slechts éénmaal gelukte bij zijn materiaal. Deze haalt een onderzoek aan van HUSTED, die op 232 pleuraexsudaten in 2 gevallen microscopisch tuberkelbacillen vond. MATTHES vindt meestal geen bacterieën in de exsudaten, ook VAN WELY³⁰¹⁾ laat zich aldus uit.

b. cultuurmethodes.

Hiervoor zijn verschillende voedingsbodems aangegeven, waarvan tegenwoordig die van LÖWENSTEIN en van HOHN wel het meest gebruikt worden. Ook die van BESREDKA en van PETRAGNANI worden veel toegepast. Daar de samenstelling dezer bodems voldoende bekend is, zal ik ze hier niet vermelden. Over het algemeen wordt aangenomen, dat men door middel van deze methoden nog vrij vaak bij negatief microscopisch onderzoek tuberkelbacillen kan aantoonen.

SAENZ en COSTIL³⁰²⁾ vonden door middel van de cultuurmethode op de voedingsbodems van LÖWENSTEIN en van PETRAGNANI (met asparagine) 6 maal een positief resultaat op 10 sero-fibrineuze exsudaten, terwijl de caviaproef 5 maal positief was. Met de cultuurmethode komt men bij positief resultaat ook nog veel vroeger tot de diagnose dan bij de dierproef. De schr. halen een onderzoek van CHEVÉ aan, die op 47 exsudaten 24 maal een positieve cultuur vond (voedingsbodem v. LÖWENSTEIN) en 23 maal een positieve caviaproef.

Wij gebruikten den voedingsbodem van HOHN en vonden bij 10 primaire tuberculeuze pleuritiden tweemaal een positieven uitslag, bij 3 „secundaire” éénmaal.

c. dierproef.

Deze, de enting van het verdachte materiaal bij een cavia, wordt vrij algemeen als de meest betrouwbare onderzoeksmethode op tuberkelbacillen in exsudaten aangegeven. SAENZ en COSTIL en CHEVÉ zijn het hiermee niet eens, zooals ik zoeven vermeld heb. GLOYNE verwacht van kweekproeven niets, caviaproeven zouden nu en dan noodig zijn. GSELL³⁰³⁾ zegt zelfs: „Der Tuberkelbazillennachweis als bindender Beweis für die tuberkulöse Genese des Brustfellergusses gelingt bekanntlich praktisch nur im Tierversuch”. Hij vond in 50% der gevallen een positief resultaat.

Wij onderzochten slechts zelden op deze wijze, aangezien we van meening waren, dat de kweekproef nagenoeg steeds positief was in de gevallen, waarbij men tuberkelbacillen mocht verwachten.

In de meest recente publicatie over dit onderwerp blijkt Mej.RUYS³⁰⁴⁾

hetzelfde standpunt in te nemen. Op grond van het onderzoek van urine, etter en lumbaalvocht komt zij tot de conclusie, dat de cavia- en de kweekproef hierbij ongeveer gelijkwaardig zijn, misschien is de caviaproef iets beter. De moeilijkheid, om in zeldzaam voorkomende gevallen, een kweek van zuurvaste saprophyten te onderscheiden van een kweek van echte tuberkelbacillen, kan voor den niet zeer geroutineerden onderzoeker een reden zijn, om de caviaproef boven de kweekproef te verkiezen.

Verder noem ik nog enkele methoden, die aanbevolen zijn speciaal ter herkenning van den tuberculeuzen aard van het exsudaat, doch die het nooit tot algemeen gebruik hebben gebracht, o.a. de bepaling der z.g.n. *peptolytische index*. Alle pathologische vochtuitstortingen in de sereuze holten bevatten een ferment, dat glycytryptophaan kan splitsen, en waarvan de hoeveelheid naar aard en herkomst van het vocht verschillend is. (De verdunning van het vocht, die nog een even aantoonbare reactie geeft, wordt „peptolytische index” genoemd). Bepaling van de hoeveelheid van dit ferment kan volgens LENK en POLLAK³⁰⁵) van waarde zijn voor de diagnose. Bij pleuraexsudaten zou een hooge waarde tusschen 100 en 200 voor den tuberculeuzen aard pleiten, beneden 100 er tegen. Het feit, dat ook carcinomateuze exsudaten een hooge index bezitten, maakt dit diagnosticum veel minder belangrijk.

Bepaling van het glucosegehalte.

Hierover heeft HERMS³⁰⁶) nog vrij kortgeleden een publicatie het licht doen zien. Het glucosegehalte is zeer verschillend: in sommige gevallen gelijk aan de concentratie in het bloed, in andere sterk verminderd (tot 10 mg. %). Bij exsudaten ziet men geen beïnvloeding doorden bloedsuikerspiegel, in tegenstelling met transsudaten. Diagnostisch heeft de bepaling geen waarde, wèl zou ze van belang zijn voor de prognose en verdere therapie bij pneumothoraxexsudaten, daar men bij spoedig resorbeerende exsudaten een vrij hoog en stijgend suikergehalte vindt (55—127 mg. %), bij chronische exsudaten een relatief laag suikergehalte (14—32 mg. %).

We zien dus, dat de onderscheiding tusschen transsudaat en exsudaat weliswaar vrij goed mogelijk is, doch dat de methoden ter bepaling van den aard van een exsudaat nogal eens te wenschen overlaten. Immers in vele gevallen kan men niet op grond van cytologisch en bacteriologisch onderzoek tot een positieve diagnose komen, terwijl dit in ascitesvloeistof, koude abscessen en gewrichtspunctaten vaak

nog moeilijker is. Glucosebepalingen en bepaling van de peptolytische index geven ons evenmin uitsluitsel. Bovendien moeten we in de gevallen, waarin kweek- of dierproef positief zijn, 3 à 4 weken of langer op den uitslag van het onderzoek wachten.

Wanneer we ons nu nog eens herinneren, wat volgens verschillende onderzoekers het serologisch onderzoek der exsudaten ons kan leeren, is de verwachting gerechtvaardigd, dat dit ons in vele gevallen zou kunnen helpen. Hiernaar is het volgende onderzoek ingesteld:

EIGEN ONDERZOEK.

Met de punctaten voerde ik de complementbindingsreactie van W. K. en K. uit op de wijze, zooals ik reeds voor het onderzoek van bloedserum heb beschreven. Het vocht werd steriel opgevangen. Meestal vormde zich spoedig een stolsel, dat verwijderd werd. Lumbaalvocht werd voor het onderzoek onverdund gebruikt, zooals dat ook gebruikelijk is bij de reactie van WASSERMANN op lues, alle andere punctaten werden evenals bloedserum 3 maal verdund met physiologische zoutoplossing.

Zooveel mogelijk heb ik getracht alle diagnostische hulpmiddelen te gebruiken. Hierbij deden zich echter vele belemmerende factoren voor. Zoo is het b.v. niet mogelijk in een exsudaat, dat een stolsel bevat, een betrouwbaar cytologisch of microscopisch onderzoek te verrichten.

Verder heb ik de caviaproef zelden toegepast, daar onze ervaring was, dat deze niet vaker positieve resultaten aanwees dan de cultuurmethode. De onderzoekingen der laatste jaren hebben aangetoond, dat dit standpunt grootendeels juist was.

Onderzocht werden in 't geheel 101 punctaten, waarvan 67 pleurapunctaten.

Hiervan waren: 42 van tuberculeuzen aard, 18 buikpunctaten, 3 van tuberculeuzen aard; 3 transsudaten; 2 kniepunctaten, 3 punctaten van koude abscessen; 1 punctaat van een verweekte klier bij lymphogranuloom; 6 lumbaalpunctaten, waarvan 1 tuberculeus.

Beschouwen we eerst de groep der 42 *pleurapunctaten van tuberculeuzen aard*. We moeten deze, om een inzicht in de waarde der uitslagen der complementbindingsreactie te krijgen, verdeelen in drie groepen:

I. Primaire tuberculeuze pleuritis.

19 punctaten	5 pos. (26.3%).
	14 neg. (73.7%).

II. Pleuritisch exsudaat, optredend bij longtuberculose.

14 punctaten	9 pos. (64.3%).
	5 neg. (35.7%).

III. Pneumothoraxexsudaten.

9 punctaten	7 pos. (77.7%).
	2 neg. (22.3%).

Hierbij vallen al dadelijk enkele belangrijke dingen op:

1e. de primaire tuberculeuze pleuritis vertoont het geringste aantal positieve reacties.

2e. de exsudaten, die als complicatie bij een bestaande pneumothorax optreden, geven het grootste aantal positieve resultaten.

I. Primaire tuberculeuze pleuritis.

Dere groep is belangrijk in dit opzicht, dat een positieve complement-bindingsreactie ons eerder in staat zou kunnen stellen de diagnose tuberculose te maken. We vinden hierbij immers zeer zelden tuberkelbacillen bij het microscopisch onderzoek en alleen het vinden van deze ziekteverwekkers kan ons met zekerheid de diagnose doen stellen. Vinden we ze niet, dan zijn we gedwongen, vóór onze definitieve beslissing: tuberculose of niet, eenige weken geduld te oefenen, om den uitslag van kweek- of caviaproef af te wachten.

a. W. K. en K. en microsc. onderzoek. (14 gevallen).

Het bleek nu, dat in 1 geval tuberkelbacillen met de directe methode in het sediment konden worden aangetoond, terwijl de W. K. en K. negatief uitviel. In 3 gevallen was de complementbindingsreactie positief, het microscopisch onderzoek negatief, terwijl het geheele beloop der ziekte deze als van tuberculeuzen aard liet herkennen. In deze 3 gevallen waren wij dus alleen door de complementbindingsreactie in staat den juiste aard van het exsudaat dadelijk vast te stellen. 10 exsudaten vertoonden een negatieve W. K. en K. en microscopisch waren er geen bacillen aantoonbaar.

W. K. en K. —	W. K. en K. +	W. K. en K. —	W. K. en K. +
microsc. +	microsc. +	microsc. —	microsc. —
1	—	10	3

b. W. K. en K. en kweek- of caviaproef. (12 gevallen).

Als we nu eens de tuberculeuze pleurapunctaten beschouwen, waarbij ook de kweek- en (of) caviaproef is verricht, dan zien we,

dat in 1 geval de W. K. en K. positief was, de kweekproef negatief. Hier stelde de complementbindingsreactie ons dus weer in staat de diagnose te stellen. In 2 gevallen liet de W. K. en K. ons in den steek, daar bij kweekproeven toch bacillen aanwezig bleken te zijn, hoewel de W. K. en K. negatief was. Bij 9 punctaten waren en W. K. en K. en kweek- of caviaproef negatief.

W. K. en K. +	W. K. en K. —	W. K. en K. —
kweek } —	kweek } +	kweek } —
cavia } —	cavia } +	cavia } —
1	2	9

c. W. K. en K., uitgevoerd in serum en exsudaat.

In 9 gevallen werden bloedserum en exsudaat gelijktijdig onderzocht. Eénmaal was het exsudaat positief, het serum negatief, in 7 gevallen waren beide negatief, in 1 geval beide positief. Hierbij heeft dus in 1 geval de uitvoering van de reactie in het exsudaat ons de juiste diagnose gebracht.

W. K. en K.	serum +	serum —	serum —	serum +
W. K. en K.	exs. —	exs. +	exs. —	exs. +
	—	1	7	1

In 3 gevallen kon alleen het exsudaat onderzocht worden: 2 maal positief en 1 maal negatief.

De complementbindingsreactie blijkt dus wel voordeelen te bezitten voor de snelle diagnose van z.g.n. primaire tuberculeuze pleura-exsudaten. In het geheel genomen vonden we dus op 19 primaire tuberculeuze exsudaten 5 positief. Onze resultaten zijn niet zoo gunstig als die van HABS en WITEBSKY, die op 16 dergelijke punctaten 10 positieve reacties vonden. Bij 5 gevallen verkregen ze een positief bacteriologisch resultaat (30%), in mijn onderzoek bij 2 der 12 onderzochte gevallen (16.6%).

II. Pleuritisch exsudaat, optredend bij long-tuberculose.

a. 7 gevallen werden serologisch en microscopisch onderzocht; in 2 gevallen gaven beide methoden een positief resultaat, in 5 gevallen alleen de complementbindingsreactie. Ook hier blijkt dus de waarde der W. K. en K. als een snel diagnosticum.

W. K. en K. —	W. K. en K. +	W. K. en K. —	W. K. en K. +
microsc. +	microsc. +	microsc. —	microsc. —
—	2	—	5

b. Slechts 5 gevallen werden met kweek- of (en) caviaproeven onderzocht. In 3 gevallen was de W. K. en K. positief, het bacteriologisch onderzoek negatief, in 1 geval de W. K. en K. negatief, de kweekproef positief, in 1 geval waren beide positief. In deze 4 gevallen heeft de W. K. en K. ons dus in staat gesteld de diagnose tuberculose te stellen.

W. K. en K. +	W. K. en K. —	W. K. en K. —	W. K. en K. +
cavia } — kweek } —	cavia } + kweek } +	cavia } — kweek } —	cavia } + kweek } +
3	1	—	1

c. 6 exsudaten werden tegelijk met het overeenkomstige serum onderzocht. Alle 6 sera en exsudaten gaven een parallel resultaat:
in 4 gevallen waren beide negatief,
in 2 gevallen beide positief.

d. In 8 gevallen kon alleen het exsudaat onderzocht worden:
5 positief.
3 negatief.

Ook voor het onderzoek der pleura-exsudaten, die bij een reeds bestaande tuberculose der longen optreden, is de complementbindingsreactie dus in staat, in enkele gevallen de aetiologische diagnose snel te stellen, in 2 gevallen was ze zelfs het eenige diagnosticum, dat een positieven uitslag gaf.

III. P n e u m o t h o r a x e x s u d a t e n .

9 dergelijke punctaten werden onderzocht. Slechts in 2 gevallen werd het vocht ook microscopisch onderzocht:

- 1 geval microscopisch positief, serologisch negatief;
- 1 geval microscopisch en serologisch negatief.

In 6 gevallen werden serum en exsudaat gelijktijdig serologisch onderzocht. Alle 6 sera en exsudaten reageerden parallel:

- 1 geval in serum en exsudaat negatief,
- 5 gevallen in beide positief.

In 3 gevallen kon alleen het exsudaat onderzocht worden, 2 reageerden positief, één negatief.

IV. C o n t r ô l e s .

Evenals dit gold voor het serologisch onderzoek van het bloedserum, moet ook hier het onderzoek der contrôlegevallen eigenlijk den doorslag geven voor de beteekeenis, die aan deze complementbindingsreactie gehecht mag worden. Welnu, wij onderzochten 25 pleuritiden van

anderen dan van tuberculeuzen aard, die allen een negatieve W. K. en K. gaven.

Onder deze 25 exsudaten kwamen voor:

14 empyemen: 12 door pneumococcen.

2 door putride flora.

8 exsudaten veroorzaakt door carcinoom (òf door obductie vastgesteld, òf door klinische diagnose).

2 bij acuut gewrichtsrheuma.

1 bij ziekte van HODGKIN.

De specificiteit der reactie van W. K. en K. in exsudaten mogen we dus niet in twijfel trekken, al is het aantal contrôlegevallen vrij gering.

Nu we de specificiteit der reactie dus voldoende vastgesteld achten, kunnen we onze uitkomsten bij pleura-exsudaten van tuberculeuzen aard nog eens overzien. We kunnen dan zeggen, dat bij onze gevallen gebleken is, dat 13 maal alleen de W. K. en K. de aetiologische diagnose met zekerheid mogelijk maakte, zeer spoedig na de punctie van het exsudaat. In 4 gevallen stelde de W. K. en K. ons zelfs tot de directe diagnose in staat, terwijl de kweekproef eenige weken later negatief bleek. Daar we met onspecifieke reacties nauwlijks rekening behoeven te houden, is de reactie dus in 13 gevallen van doorslaande beteekenis voor de diagnose geweest.

Ascitespunctaat.

Hierbij zijn de resultaten veel minder bevredigend. Er werden 18 punctaten onderzocht, allen met negatief resultaat. Hieronder bevonden zich drie punctaten van een tuberculeuze peritonitis. (In 2 hiervan waren ook met kweekproeven geen tuberkelbacillen aantoonbaar, 1 werd hierop niet onderzocht) en 15 van ascites ten gevolge van carcinoma peritonei.

Hoewel we hier bij tuberculose geen positief resultaat verkregen, wijst toch ook de negatieve uitslag bij ascites van niet-tuberculeuzen aard op een groote mate van specificiteit.

Gewrichtspunctaten.

1 punctaat van een gonitis door coccen reageerde negatief.

1 punctaat van een bursitis praepatellaris (volgens den chirurg zeker geen tuberculose): negatief.

Koude abscessen.

1 punctaat reageerde positief, hierin werden met de caviaproef tuberkelbacillen aangetoond.

2 reageerden negatief, waarvan één bacteriologisch positief bleek, het andere is niet nader onderzocht.

De pus uit het verweekte lymfoom van den patient met de ziekte van Hodgkin reageerde negatief, doch is bacteriologisch niet nader onderzocht.

Lumbaalvocht.

1 punctaat van een meningitis tuberculosa en 5 punctaten van andere aandoeningen reageerden allen negatief.

VERGELIJKING MET DE RESULTATEN VAN VORIGE ONDERZOEKERS:

Pleura exsudaten.

Over het algemeen geven de verschillende schrijvers bij de vermelding hunner onderzoekingen van tuberculeuze exsudaten niet op, van welken aard deze zijn, of ze z.g.n. „primaire” zijn, of voorkomen als complicatie bij reeds aanwezige longtuberculose of pneumothorax.

MICHAÏLOW en ook HABS en WITEBSKY maken hierop een uitzondering, zoodat ik zal beginnen mijn resultaten met die van hen te vergelijken.

	„Primaire” pleuritis.			„Secundaire” pleuritis.			Pneumothorax- exsudaten.			Contrôle's.		
	to- taal	+	—	to- taal	+	—	to- taal	+	—	to- taal	+	—
HABS en WITEBSKY	18	10(55%)	8(45%)	15	11(73%)	4(27%)	—	—	—	25	1(4%)	24(96%)
EIGEN ONDERZOEK	19	5(26%)	14(74%)	14	9(64%)	5(36%)	9	7(78%)	2(22%)	25	—	25(100%)
MICHAÏLOW	6	3(50%)	3(50%)	6	3(50%)	3(50%)	13	12(92%)	1(8%)	9	—	9(100%)

Indien men de gevonden percentages vergelijkt, lijken de uitkomsten van HABS en WITEBSKY en van MICHAÏLOW over het algemeen beter. Doch de gemiddelde fout is hier, vooral door de kleine getallen, zoo groot, dat we niet kunnen zeggen, dat het gevonden verschil reël is, het kan op toevallige omstandigheden berusten.

De andere, reeds besproken schrijvers geven meestal geen gedetailleerde vermelding hunner uitkomsten. Daarom zal ik, om een indruk te geven, hun totale aantal vergelijken met dat van mijn onderzoek.

		<i>Tuberculeuze pleura-exsudaten.</i>			<i>Niet-tuberculeuze pleura exsudaten.</i>		
		totaal	+	—	totaal	+	—
Agglutinatie reactie	COURMONT 1898	11	10 (90%)	1 (10%)	6	1 (16%)	5 (84%)
PETROFF-antigeen: compl.b.	OGAWA 1922	12	11 (91%)	1 (9%)	5	—	5 (100%)
Compl.b. WASSERMANN	Vos 1925	12	4 (33%)	8 (67%)	5	—	5 (100%)
Compl.b. BESREDKA	MICHALOW 1925	25	18 (72%)	7 (28%)	9	—	9 (100%)
Compl.b. W. K. en K.	HABS EN WITEBSKY 1933	33	21 (64%)	12 (36%)	25	1 (4%)	24 (96%)
Compl.b. W. K. en K.	SCHLESMAHN 1935	11	7 (63%)	4 (37%)	—	—	—
Compl.b. K. W. en K.	EIGEN ONDERZOEK	42	21 (50%)	21 (50%)	25	—	25 (100%)

Ascites punctaat.

Zooals reeds gezegd, konden we bij 18 punctaten geen positieve uitkomsten noteeren, hierbij waren 3 van vrijwel zeker vaststaande tuberculeuze peritonitis. Vergelijking met de uitkomsten van andere schrijvers is bij dit onderzoek lastig, daar betrekkelijk weinigen zich tot dit onderzoek hebben gewend, en steeds een klein aantal onderzocht is. Als ik tracht, toch eenigszins een overzicht van het bereikte te geven, komen we tot het volgende resultaat: (zie volgende tabel).

Laten we de resultaten van COURMONT buiten beschouwing, omdat deze een agglutinatiereactie gebruikte, die naderhand in onbruik geraakt is, dan zien we, dat ook bij de tuberculeuze peritonitis in enkele gevallen antilichamen aantoonbaar zijn, al is dit ons zelf niet

gelukt. Ook bij het onderzoek van ascitesvloeistof van onbekenden oorsprong kan de complementbindingsreactie dus een enkele keer van waarde zijn.

	<i>Ascitesvocht van t.b.c. peritonitis.</i>			<i>Ascitesvocht van niet- t.b.c. peritonitis.</i>		
	totaal	+	—	totaal	+	—
COURMONT 1898 agglutinatiereactie	5	5	—	7	—	7
SLATINÉANU en DANIELOPOLU. 1909. compl.b.	2	2	—	—	—	—
BOUVIER 1923. compl.b. BESREDKA	1	1	—	—	—	—
MICHAÏLOW 1925. compl.b. BESREDKA	1	—	1	—	—	—
HABS en WITEBSKY 1933 compl.b. W. K. en K.	—	—	—	14	—	14
FREDERIKSEN 1934. eigen compl.b.	1	—	1	—	—	—
SCHLESMAUN 1935. compl.b. W. K. en K.	1	—	1	—	—	—
EIGEN ONDERZOEK	3	—	3	15	—	15

Gewrichtspunctaten.

Ons materiaal is onbeteekenend. Ik wil echter eenige gegevens der literatuur toch even bespreken. HABS en WITEBSKY vermelden het onderzoek van 6 punctaten van gewrichten, waarin tuberkelbacillen werden gevonden. Bij 4 hiervan was de complementbindingsreactie positief, bij 2 negatief. In 1 geval werd een positieve reactie gevonden, bij negatief bacteriologisch onderzoek. MICHAÏLOW: 1 punctaat van een gonitis tuberculosa: positief.

Koude abscessen.

Op 3 onderzochte punctaten vonden we één serologisch positief. Weliswaar werden hierin later door middel van de caviaproef tuberkelbacillen aangetoond, doch de mogelijkheid hier de diagnose direct

te stellen, moet toch als winst beschouwd worden. HABS en WITEBSKY onderzochten 8 dergelijke punctaten, met 3 positieve reacties.

WITEBSKY en KLINGENSTEIN zeggen dan ook in hun reeds meer genoemde overzicht op blz. 151 der tuberculose-serodiagnostiek: „ein recht geeignetes, aber noch selten herangezogenes Material zum Nachweis von Antikörperfunktionen sind wahrscheinlich die Senkungsabszesse”.

Het onderzoek van het lumbaalvocht leent zich niet tot een vergelijking met resultaten van anderen, daar het niet uitgebreid genoeg is geweest. Over het algemeen worden bij de tuberculeuze meningitis geen antilichamen in de liquor gevonden, zooals ook WITEBSKY en KLINGENSTEIN aangeven.

COURMONT vond weliswaar reeds in 1898 met een agglutinatiereactie in 25 van de 27 gevallen een positief resultaat, doch geen der latere onderzoekers heeft op een dergelijk succes mogen bogen.

ARLOING en LANGERON ³⁰⁷⁾ vermelden een negatieve reactie bij tuberculeuze meningitis in lumbaalvocht met een hoog albuminegehalte.

SCHLESMAHN ²⁹¹⁾ onderzocht 17 liquoren, waarvan slechts één matig positief reageerde.

Uit deze vergelijkingen blijkt dus ook hier, evenals dit het geval was bij het serumonderzoek, dat mijn aantal positieve uitkomsten geringer is dan dat van andere onderzoekers, doch dat eveneens het aantal onspecifieke reacties kleiner is geweest. We zouden hier dezelfde beschouwingen over kunnen houden als we bij het serumonderzoek hebben gedaan, aangezien hier natuurlijk dezelfde regels gelden.

SAMENVATTING.

De bedoeling was te onderzoeken, of de complementbindingsreactie, volgens WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN, van belang kon zijn voor de diagnostiek. Hiernaar werd een onderzoek ingesteld door de reactie uit te voeren, zoowel met bloedserum als met exsudaten van tuberculosepatienten, lijders aan andere ziekten en normalen.

Wegens het groote belang van een juist samengesteld antigeen en tot beter begrip van de antigene eigenschappen der tuberkelbacillen, werd een beknopt overzicht gegeven over de resultaten, die totnutoe met de chemische analyse der tuberkelbacillen bereikt zijn en over de biologische eigenschappen der verschillende bestanddeelen. Hierbij werd speciale aandacht besteed aan de tuberculophosphatiden, die in serologisch opzicht zoo belangrijk zijn en tevens typisch tuberculeuze weefselveranderingen kunnen veroorzaken. Bij de bespreking der analyse der tuberkelbacillen sluit een kort overzicht aan over de chemische en serologische verwantschap met diphtherie- en lepra-bacillen.

De moeilijke quaestie der samenstelling der antigenen werd uitvoerig besproken evenals het werk van vroegere onderzoekers. De antigenen van BESREDKA, BOQUET en NÈGRE, KLOPSTOCK en NEUBERG bleken de belangrijkste. Doch allen zijn thans ten achter te stellen bij het antigeen van WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN. Daar het antigeen van WASSERMANN indertijd zeer veel opgang maakte, en bij de bespreking daarvan vele problemen, o.a. dat der lecithinetoevoeging, aan de orde kwamen, heeft dit een ruimere plaats gekregen, dan het volgens zijn eigenlijke beteekenis toekomt.

Vervolgens wordt gesproken over de moeilijkheden, die voor het serologisch onderzoek ontstaan, doordat de tuberculose een zeer bijzondere infectieziekte is: bij uitstek chronisch en enorm onder de bevolking verbreid, zonder dat allen er ziek van zijn of geweest zijn. Het chronische karakter, de over het algemeen geringe intensiteit der tuberculose als ziekte, maakt, dat de reactie van het lichaam ook minder heftig is, dat er dus zeer waarschijnlijk daardoor al minder antilichamen zullen ontstaan. De enorme verbreidheid maakt het mogelijk, dat bij bijna iedereen in geringe mate antilichamen te verwachten zijn. De aanwezigheid van verborgen haarden maakt de

beoordeeling van den uitslag der reactie moeilijk, als deze positief is. Tenslotte vindt men in verschillende stadia der tuberculose als ziekte, een verschillende hoeveelheid antilichamen. Het wordt aannemelijk gemaakt, dat deze factoren allen van belang zijn. Het is voor ieder serologisch onderzoek van belang over de eigenschappen van het te onderzoeken serum ingelicht te zijn. Hierom is een bespreking ingevoegd over de lipoiden, de serumlabiliteit, de anamnestiche reacties, de „substance inhibitrice” van CALMETTE, onspecifieke haemolysinen en over de bloedveranderingen bij icterus.

Het vraagstuk der specificiteit der reacties wordt van zeer vele zijden belicht, daarbij nog eens de kans van een onopgemerkte infectie besproken, evenals de storende invloed van een luetische infectie.

Vervolgens wordt een kort overzicht gegeven over de verschillende methodes, die in den loop der jaren voor de tuberculosereacties zijn aangegeven: agglutinatie-, praecipitatie-, labiliteits-, coagulatie-, en complementbindingsreacties, waarbij de laatste uitgebreid worden behandeld.

Na een bespreking der resultaten, in de literatuur vastgelegd, verkregen met de verschillende complementbindingsreacties, wordt overgegaan tot het eigen onderzoek van 868 bloedsera. Van 364 sera, afkomstig van gevallen van longtuberculose, werd bij 46.6% een positieve reactie gevonden, bij de zware gevallen (caverneuze longtuberculose) 68%, bij de lichte gevallen in 10.3 à 18%. De aandacht wordt er op gevestigd, dat men een zeer duidelijke bepaling noodig heeft voor wat positief genoemd moet worden, en dat de z.g.n. 1e. aflezing volgens WITEBSKY, KLINGENSTEIN en KUHN teveel onspecifieke resultaten geeft. Een rubriek „dubieus” moet vervallen; deze resultaten moeten tot de negatieve gerekend worden.

(20 Gevallen van extrapulmonale tuberculose gaven geen aanleiding tot bijzondere opmerkingen).

Het is zeker opmerkelijk, dat ik in mijn onderzoek zooveel minder fraaie resultaten had dan andere onderzoekers, d.w.z. de gevallen van tuberculose gaven in een kleiner percentage positieve resultaten. Hiervoor werden verschillende verklaringen aangevoerd. Aan het slot wordt een aantal beknopte ziektegeschiedenissen aangehaald.

Een nog belangrijker punt, het onderzoek naar het voorkomen van onspecifieke reacties, viel bevredigender uit, daar de specificiteit, vooral ook ten opzichte van lues, zeer groot was. Serumlabiliteit beïnvloedt den uitslag der reactie niet. Het percentage onspecifieke reacties bedroeg 5.2%.

De conclusie moet dan ook zijn, dat een positieve reactie, indien

malaria, diphtherie, lepra en bijzonder sterke bloedveranderingen uitgesloten kunnen worden, sterk voor het bestaan van tuberculose pleit. In ieder geval dient het verdere onderzoek in deze richting uitgebreid te worden. Een negatieve reactie sluit het bestaan van tuberculose, ook van een actieve en uitgebreide, echter in het geheel niet uit.

Het onderzoek der exsudaten op tuberculose-antilichamen:

Uitvoerig worden de betrekkelijk weinige onderzoekingen, die er totnutoe met exsudaten verricht zijn, besproken. Verschillende publicaties gewagen o.a. van het eerder optreden van een positieve tuberculosereactie in het pleuritische exsudaat dan in het bloedserum. Uit de aangehaalde litteratuur blijkt, dat dit onderzoek ons in vele gevallen in diagnostisch opzicht kan helpen.

Om een inzicht te krijgen, hoever onze diagnostiek met de totnutoe meest gebruikelijke hulpmiddelen gevorderd is, worden de voornaamste onderzoeksmethoden (bepaling van het eiwitgehalte, proef van RIVALTA, bepaling van het s.g., celonderzoek, bacteriologisch onderzoek, onderzoek op glucosegehalte), besproken. Speciaal aan het bacteriologisch onderzoek werd meer aandacht gewijd en de voor- en nadeelen der kweek- en caviaproeven uiteengezet. Het wordt dan duidelijk, dat een nieuw diagnosticum zeer welkom zou zijn.

Exsudaten van patienten met tuberculeuze pleuritis en peritonitis, peritoneaalcarcinoom, longcarcinoom, postpneumonische empyemen en lymphogranuloom werden onderzocht, evenals pus uit koude abscessen, gewrichtspunctaten en lumbaalvocht. Zooveel mogelijk werd behalve de complementbindingsreactie ook uitgevoerd: bepaling van het soortelijk gewicht, bepaling van het eiwitgehalte, proef van RIVALTA, onderzoek der cellen, microscopisch onderzoek op tuberkelbacillen, kweekproef op tuberkelbacillen, soms de caviaproef.

42 tuberculeuze pleuraexsudaten gaven in 50% een positief resultaat.

25 niet-tuberculeuze pleuraexsudaten gaven geen enkelen positieven uitslag.

We komen tot de conclusie, dat de reactie zeker van waarde is, en wel indien deze positief blijkt te zijn. Een positieve reactie beteekent met zeer groote waarschijnlijkheid, na uitsluiting van de reeds eerder genoemde ziekten: malaria, lepra, diphtherie, dat het exsudaat van tuberculeuzen aard is. Een negatieve reactie heeft hier geen diagnostische waarde, evenmin als bij het bloedserum.

Vervolgens worden de resultaten van andere onderzoekers met de hier verkregene vergeleken, waarbij blijkt, dat deze vrijwel dezelfde waren.

We komen tot deze gevolgtrekkingen:

1. Pleurapunctaten, die een positieve complementbindingsreactie volgens W. K. en K. geven, zijn, als men malaria, diphtherie, lues en lepra uitsluit, van tuberculeuzen aard.
2. Een exsudaat, dat ontstaan is in een pneumothorax, reageert vaker positief dan een zgn. „primair” exsudaat.
3. Het pleuravocht reageert soms positief, het serum negatief, nooit omgekeerd.
4. Ascitesvocht van een tuberculeuze peritonitis geeft meestal geen positieve complementbindingsreactie.

De grootte der hoeveelheid antilichamen zegt niets over den immuniteitstoestand en veel antilichamen beschermen niet tegen uitbreiding der ziekte, beteekenen eerder, dat er een sterke antigeen-prikkel aanwezig is. Zoodra deze prikkel zwakker wordt, de ziekte-toestand verbetert, vermindert de hoeveelheid antilichamen. We kunnen dus bijna zeggen, dat hier het tegengestelde plaats heeft van hetgeen men bij acute infectieziekten ziet, waarbij men na het overwinnen der ziekte, antilichamen in groote hoeveelheid vindt. De antilichamen bij tuberculose moeten, zooals CALMETTE het uitdrukt, beschouwd worden, als „les témoins de l'infection”. NEUFELD zeide ook reeds in 1921, dat bij de tuberculose een evenwichtstoestand ontstaat tusschen antilichamen en verwekkers. Want ontstond er een absolute immuniteit, dan zou de tuberculose geen chronische, maar een acute infectieziekte zijn en de tuberculose zou een kinder-ziekte zijn evenals de mazelen.

ZUSAMMENFASSUNG.

Der diagnostische Wert der Komplementbindungsreaktion auf Tuberkulose von WITEBSKY, KLINGENSTEIN und KUHN wurde untersucht.

Diese Reaktion wurde mit Blutsera und Exsudaten von Tuberkulosepatienten, anderen Kranken und Sera von gesunden Personen ausgeführt.

Da eine richtige Zusammensetzung der Antigene sehr wichtig ist, und um eine bessere Übersicht zu bekommen über die antigenen Eigenschaften von Tuberkelbazillen, wurden die Resultate, die man bis jetzt mit der chemischen Analyse der Tuberkelbazillen erreicht hat, sowie die biologischen Eigenschaften der verschiedenen Bestandteile besprochen.

Die Tuberkulophosphatiden, serologisch so interessant, können ausserdem typische tuberkulöse Gewebeveränderungen verursachen. Auch die serologische und chemische Verwandtschaft mit Diphtherie- und Leprabazillen wurden besprochen.

Die schwierige Frage der Zusammensetzung der Antigene wurde ausführlich behandelt, sowie die Arbeiten früherer Autoren. Die Antigene von BESREDKA, BOQUET und NÈGRE, KLOPSTOCK und NEUBERG, waren die Besten. Seit einigen Jahren hat man im Antigen von WITEBSKY, KLINGENSTEIN und KUHN ein besonder gutes Antigen bekommen.

Viele Faktoren erschweren die serologischen Untersuchungen bei der Tuberkulose: die Tuberkulose ist eine *chronische* Krankheit, daher ist es zu verstehen, dass man kaum grössere Mengen Antikörper findet; beinahe jeder hat eine tuberkulöse Infektion durchgemacht; verborgene Herde geben, scheinbar falsche, positive Resultate; in den verschiedenen Stadien der Krankheit findet man verschiedene Mengen Antikörper.

Die störenden Faktoren, wie Serumlabilität, anamnestiche Reaktionen u.s.w. werden auseinander gesetzt.

Die eigene Arbeit enthält die Untersuchung von 868 Blutsera, wovon 364 von Tuberkulosefälle. 46.6% dieser Tuberkulosefälle gaben eine deutlich positive Reaktion, die schwereren Fälle (cavernöse Lungen t.b.c.) in 68%, die leichteren Fälle in 10.3% bis 18%. Der Ausdruck:

„dubiös positiv“ wurde absichtlich vermieden, solche Reaktionen wurden als negativ bezeichnet.

Die Untersuchung der Kontrollfälle gab ein befriedigendes Resultat: 5.2% positiv. Besonders die Spezifität bei der Untersuchung von Luessera ist gross. Das Endresultat ist, dass eine positive Reaktion sehr für Tuberkulose spricht, wenn man Malaria, Diphtherie, Lepra, Lues und besonders ausgesprochene Blutveränderungen ausschliessen kann.

Jedenfalls muss die ganze Untersuchung hiermit Rechnung tragen. Bei einer negativen Reaktion kann sogar eine aktive Tuberkulose sehr gut bestehen.

Die Untersuchung der Exsudate ergab das folgende Resultat:

42 tuberkulöse Pleuraexsudate gaben in 50% eine positive Reaktion.

25 nicht-tuberkulöse Pleuraexsudate gaben keine einzige positive Reaktion.

Wir können aus diesem Resultat folgendes schliessen:

1. Pleurapunktate, die eine positive Komplementbindungsreaktion nach WITEBSKY, KLINGENSTEIN und KUHN geben, sind, wenn man Malaria, Diphtherie, Lues und Lepra ausschliessen kann, von tuberkulöser Herkunft.
2. Ein Exsudat, entstanden in einer Pneumothoraxhöhle, reagiert öfter positiv als ein s.g.n. „primaires“ Exsudat.
3. Das Pleurapunktat reagiert manchmal positiv, das Blutserum negativ, nie umgekehrt.
4. Ascitesflüssigkeit einer tuberkulösen Peritonitis reagiert meistens negativ.

LITERATUURLIJST.

1. Kl. Woch. 1933. S. 1945.
2. Erg. der Hyg., Bakter. u.s.w. Bd. 6, S. 103—232. (1923).
3. Zie Kolle u. Hetsch. Exper. Bakter. u. Infekt. krankh. Bd. I. S. 337. (1919).
4. R. Koch; Berl. Klin. Woch. 1882. S. 221.
5. C. R. Soc. Biol. 30-4-1898. p. 474.
6. C. R. Hebd. des Séances de l'Académie des Sciences. Bd. 126. p. 1398. (1898). 13-4-1898. Voordracht op congres interne geneeskunde te Montpellier.
7. C. R. Hebd. des Séances de l'Académie des Sciences Bd. 125. p. 515. (1897).
8. C. R. Hebd. des Séances de l'Académie des Sciences Bd. 126. p. 1550. (1898).
9. Zie Max Pinner. Die Serodiagnose der Tuberkulose. 1927. Tuberkulose-Bibl. Beih. 28.
10. Congrès pour l'étude de la tuberculose. Paris. Juli-Aôut. 1898. p. 578.
11. Rev. de la Tuberculose 1920. p. 447.
12. Semaine Médicale 1901. p. 228.
13. C. R. Soc. Biol. Bd. 53. p. 734. (1901).
14. Dtsch. med. Woch. Bd. 11. S. 829. (1901).
15. Ned. Tijdschrift voor Geneeskunde 1903. II. blz. 61.
16. Ann. Inst. Pasteur. 1901. p. 289.
17. Zschr. f. Imm. Forschung. Bd. 6. S. 344. (1910).
18. Ned. Tijdschrift voor Geneeskunde 1908. II. blz. 1074.
19. C. R. Hebd. des Séances de l'Académie des Sciences. vol. 137. p. 351. (1903).
20. Centralbl. f. Bakter. Orig. Bd. 43. S. 391. (1907).
21. Z.Schr. f. Imm. Forschung. u. exp. Therapie. 1914. Bd. 21.
22. Ann. Inst. Pasteur. Bd. 35. p. 291. (1921).
23. C. R. Soc. de Biol. Bd. 119. p. 252. (1935).
24. Ann. Inst. Pasteur. Bd. 35. p. 797. (1921) en Dtsch. Archiv f. klin. Med. Bd. 138. (1921).
25. Dtsch. med. Woch. 1923. blz. 303.
26. Rev. de la Tuberculose 1921. p. 366.
27. Klin. Woch. 1926. S. 1078.
28. Zbl. Bakter. Bd. 122. S. 65. (1931).
29. Z. Tbk. Bd. 64. H. I. (1932).
30. Zentralbl. f. d. ges. T.b.k.forschg. Bd. 42. H. 1—2. (1935).
31. Physiol. Rev. Bd. 12. p. 166. (1932).
32. J. Biol. Chem. Bd. 106. p. 87. (1934).
33. J. Biol. Chem. Bd. 112. p. 759. (1935—1936).
34. Anderson. J. Biol. Chem. Bd. 74. p. 525. (1927).
35. F. Heideberger en Menzel. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. Bd. 29. p. 631. (1932).
36. J. Biol. Chem. Bd. 114. p. 467. (1936).
37. J. Biol. Chem. Bd. 85. p. 339. (1929).
38. J. Biol. Chem. Bd. 101. p. 773.

39. Ann. Inst. Pasteur. Bd. 52. 277. (1934).
40. Americ. Rev. Tbc. Bd. 18. p. 505. (1928). (Johnson en Renfrew).
41. Brit. J. of. Exper. Pathol. Bd. 6. p. 197. (1925).
42. Z. Imm. Fschg. Bd. 14. S. 359. en Bd. 15. S. 245. (1912).
43. Am. Rev. T.b.c. vol. 18. p. 497. (1928).
44. Z. Imm. Fschg. Bd. 82. S. 258. (1934).
45. Ann. Inst. Pasteur. Bd. 55. p. 38. (1935 II).
46. J. Exp. Med. Bd. 46. p. 627 en p. 645. (1927).
47. J. Exp. Med. Bd. 52. suppl. No. 3. (1930).
48. Physiol. Rev. Bd. 12. p. 141. (1932).
49. Naar Kallos en Kallos-Deffner. Zie nr 30.
50. Virchows Archiv. Bd. 294. S. 262. (1935).
51. Lotta contro la tubercolosi Ao. V. No. 12. Ao. VI. No. 1. Dec. 1934. Jan. 1935. Ref.
52. J. Exp. Med. Bd. 53. p. 51. (1931).
53. Sabin en Doan. J. Exp. Med. Bd. 46. p. 645. (1927).
54. Z. Imm. Forschg. Bd. 85. S. 328. (1935).
55. J. Exp. Med. Bd. 40. p. 301. (1924).
56. Klin. Woch. 1925. I.S. 1057.
57. Ann. Inst. Pasteur. Bd. 35. p. 294. (1921).
58. Erg. Tuberk. Forschg. 1933. V.S. 131.
59. Naar Wassermann, in Dtsch. med. Woch. S. 303. (1923).
60. Klin. Woch. 1931. I.S. 1068.
61. Z. Imm. Forschg. Bd. 66. S. 59. (1930).
62. Dtsch. med. Woch. 1923. I.S. 603.
63. C. R. Soc. Biol. Bd. 86. p. 331. (1922).
64. Dermatol. Woch. 1932. II. S. 1688.
65. L'Infection bacillaire et la Tuberculose 1936. p. 699.
66. Centralbl. f. Bakter. Origin. Bd. 43. S. 391. (1907).
67. Calmette. L'Inf. Bacill. et la Tuberculose. 1936. p. 701.
68. C. R. Soc. Biol. Bd. 119. p. 252. (1935).
69. Arch. Int. Med. Bd. 14. p. 786. (1914).
70. Bronfenbrenner, Kahn, Rockmann, Kahn. Arch. Int. Med. Bd. 17. p. 492. (1916).
71. Dtsch. med. Woch. 1924. S. 673.
72. Dtsch. med. Woch. 1923. S. 303.
73. Dtsch. med. Woch. 1923. I.S. 603.
74. Journ. of Imm. Bd. 12. p. 123. 1926. (Ref. Zentral.bl. ges. Tb.c.forschg.).
75. N. T. v. G. 1925. blz. 2125.
76. Rev. de la Tuberc. 1921. p. 366.
77. Rev. espan. Med. 11. 1928. (Ref. Z. f. d. ges. Tbc F. 1929).
78. Zschr. f. Tbk. Bd. 63. S. 81. (1931).
79. C. R. Soc. Biol. Bd. 109. p. 361. 1932. gecit. naar Calmette.
80. C. R. Soc. Biol. Bd. 114. p. 130. (1934).
81. Klin. Woch. 1926. S. 1078.
82. Dtsch. med. Woch. 1927. S. 267. Ref. Zschr. f. d. ges. Tbc F. 1927.
83. Z. Tbk. Bd. 63. S. 81. (1931).
84. Geneesk. Bladen. 1933. 30e reeks.
85. Pflügers Archiv. S. 248. Bd. 185. (1920).

86. Z. Imm. Forschg. Bd. 85. S. 249. (1935).
87. Klin. Woch. 1931. S. 2329.
88. Klin. Woch. 1934. I.S. 838.
89. Z.schr. f. Tuberk. Bd. 53. (1929).
90. Ausgewählte Schriften zur Tuberkulosepathologie von K. E. Ranke, uitgeg. door W. en H. Pagel. Beiheft zu den Beitr. Klin. Tbk. Bd. 6. S. 213. (1928).
91. Z.bl. inn. Med. 1932. S. 290.
92. Tuberkulose. 1933. S. 144.
93. Witebsky en Klingenstein: Erg. der Tbk. Forschg. V.S. 169. 1933.
94. Beitr. Klin. Tbk. Bd. 88. S. 181. (1936).
95. Erg. Tbk. Forschg. Bd. V. S. 170. 1933.
96. Beitr. Klin. Tbk. Bd. 89. H. 5. 1937.
97. Gruzlica Bd. 11. S. 345. (1936). gecit.
98. Klin. Woch. 1934. S. 258.
99. Zie Bendien, Neuberg en Snapper. Geneeskundige Bladen. 1933. 30e reeks blz. 2.
100. C. R. Soc. Biol. Bd. 76. p. 180. (1914).
101. Zschr. Imm. Forschg. u. Exp. Ther. Bd. 21. (1914).
102. Verslagen der Tbc. Studie Cie der Ned. Centr. Ver. tot Bestr. der Tbc. 1927. blz. 92.
103. Zschr. f. Tuberk. Bd. 34. S. 312. (1921).
104. Calmette, L'Inf. Bacill. et la Tuberculose 1936. p. 715.
105. Erg. der Tbk. Forschg. Bd. V. 1933. S. 150.
106. Proc. Royal Soc. B. vol. 84. p. 373. (1911).
107. Amer. Rev. of tuberc. Bd. 11. p. 508. (1925).
108. Amer. Rev. of tuberc. vol. 30. p. 619. 1934.
109. Calmette, L'Infection bacillaire et la Tuberculose 1936. p. 719.
110. Jusatz-Bersin-Köster. Klin. Woch. 1935. S. 1419.
111. Z. Imm. Forschg. Bd. 88. S. 472. (1936).
112. Z.Schr. f. Tbk. Bd. 75. S. 336. (1936).
113. Klin. Woch. 1931. S. 1239. Vergaderingsverslag.
114. Klin. Woch. 1932. S. 1487. Vergaderingsverslag.
115. Bioch. Z.schr. Bd. 37. S. 78. (1911).
116. Z. Imm. Forschg. Bd. 40. S. 237. (1924).
117. Erg. ges. Tbk. Forschg. Bd. V. S. 148. (1933).
118. Lotta contra la tubercolosi. Ao. VII. No. 7. Juli 1936. Ref.
119. Berl. Klin. Woch. 1899. S. 6.
120. Arch. Hyg. Bd. 103. S. 221. (1930).
121. C. R. Soc. Biol. Bd. 86. p. 278. (1922).
122. Zbl. Inn. Med. S. 290. 1932.
123. Calmette, L'infection bacillaire etc. 1936. p. 928 en 930.
124. Am. Rev. Tub. Bd. 31. p. 54. (1935).
125. Verslagen der Tbc Studie Cie 1927. blz. 40.
126. Ann. Inst. Pasteur. Bd. 44. p. 59. (1930).
127. Clin. Les. N. T. v. G. 7 Maart 1936. blz. 945.
128. Urbain en Fried. Ann. Inst. Pasteur. Bd. 35. p. 294. 1921.
129. Klopstock. Dtsch. Med. Woch. 1923. I. S. 603. en Witebsky en Krah, Zschr. Imm. Forschg. Bd. 66. S. 59. (1930).
130. Erg. der ges. Tbk. F. Bd. V. S. 131. (1933).
131. Med. Klin. 1933. S. 976.

132. Klin. Woch. 1936. S. 1718.
133. Klin. Woch. 1933. S. 460.
134. Beitr. Klin. Tbk. Bd. 81. S. 284. 1932.
135. Med. Klin. 1932. S. 689.
136. Stokes, Modern Clinical Syphilology 1934. p. 131.
137. Internat. ser. congres in Kopenhagen 1928.
Meinicke Klin. Woch. 1934. S. 258.
Simons. Geneeskundige Bladen. 34e reeks X. blz. 331.
F. Klein. N. T. v. G. 1937. IV. blz. 5516.
Klein. Waarnemingen bij onbehandelde luetici. Acad. Proefschrift,
Groningen. 1937. blz. 37.
138. Bor'ba. s. Tbk. 1935. S. 49. Ref. (Russisch).
139. Bouvier. Thèse Méd. 1923. Dépistage de la tuberculose et Réaction de
déviation du complément.
140. Verslagen der Tbc. Studie Cie. der Ned. Centr. Ver. tot Bestrijding der
Tuberculose 1927. blz. 92.
141. Münch. Med. Woch. 1937. S. 179.
142. Journ. méd. franç. 1922. p. 370. Ref.
143. Med. Westnik. Sapadnawo. Fronta. Nr. 2. 1922. Ref.
144. Brit. Med. J. Nr. 3288. p. 15. (1924).
145. Beitr. Klin. Tbk. Bd. 66. S. 562. 1927.
146. Münch. Med. Woch. 1927. S. 280.
147. Z. Tbk. Bd. 63. S. 81. (1931).
148. Beitr. Klin. Tbk. Bd. 76. S. 642. (1931).
149. Ann. Inst. Pasteur. Bd. 35. p. 300. 1921 en Rev. de la tub. 1921. p. 366.
150. Rev. de la tub. 1921. p. 393.
151. N. T. v. Geneeskunde. 1925. blz. 1412.
152. Münch. Med. Woch. 1924. S. 539.
153. Dtsch. Med. Woch. 1924. S. 673. Z.bl. Bakter. Bd. 122. S. 62. (1931). Beitr.
Klin. Tbk. Bd. 81. S. 280. (1932).
154. Lignitz Inaug. Diss. Leipzig. 1933.
155. Rev. de la Tuberculose 1921. p. 368.
156. Münch. Med. Woch. 1922. S. 1035.
157. Lotta contra la tuberculosi Ao. VII. Juli 1936. Ref.
158. Rev. d. l. Tuberc. 1920. p. 447.
159. Rev. d. l. Tuberc. 1922. p. 168. Ref.
160. C. R. Soc. Biol. Bd. 92. p. 971. 1925.
161. Klin. Woch. 1923. S. 635.
162. Dtsch. Med. Woch. 1924. I. S. 375.
163. Med. Klin. Bd. 25. S. 1130. (1929).
164. Tuberculose. Bd. 11. S. 232. (1931).
165. Med. Klin. Bd. 25. S. 1167. (1929).
166. Erg. Tuberk. F. 1933. Bd. V. S. 161.
167. Immunität usw. 1929. S. 117.
168. Z. Tbk. Bd. 55. S. 133. (1929).
169. Beitr. Klin. Tbk. Bd. 81. S. 284. (1932).
170. a. Münch. Med. Woch. 1926. S. 1578.
b. Z. Imm. Forschg. Bd. 51. S. 196. 1927.
c. Loeschke, Beitr. Klin. Tbk. 1932. S. 286.

171. Beitr. Klin. Tbk. Bd. 68. S. 545. (1928).
172. Klin. Woch. 1933. S. 333.
173. Klin. Woch. 1931. S. 2389.
174. Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. vol. 26. p. 672 (1929).
175. Amer. Rev. Tuberc. Bd. 23. p. 409. (1931).
176. Amer. Rev. Tuberc. Bd. 31. p. 307. (1935).
177. Klin. Woch. 1934. I. S. 833.
178. Klin. Woch. 1935. S. 1206.
179. Beitr. Klin. Tbk. Bd. 86. 1935.
180. Münch. Med. Woch. 1936. S. 1711.
181. Beitr. Klin. Tbk. Bd. 88. S. 285. (1936).
182. Z. Tbk. Bd. 75. S. 171. (1936).
183. Med. Welt. 1936. S. 1647.
184. Zentralbl. f. d. ges. T.b.c. F. Bd. 46. S. 401. 1937.
185. Dtsch. Med. Woch. 1936. I. S. 920.
186. Tuberkulose. Bd. 16. S. 246. (1936).
187. Klin. Woch. 1937. S. 337.
188. Klin. Woch. 1934. S. 260.
189. Erg. Tbk. Forschg. Bd. V. S. 163. 1933.
190. Presse Méd. 1934. p. 960.
191. Amer. Rev. Tuberc. Bd. 18. p. 513. 1928.
192. Med. Klin. 1923. S. 725.
193. Zie Deist.: Tuberkulose 1929. S. 52.
194. Z. Tbk. Bd. 48. S. 31. (1927).
195. Med. Klin. 1930. S. 240.
196. Z. Klin. Med. Bd. 118. S. 644. (1931).
197. Roovers Proefschrift. Amsterdam. 1936.
Beunders. N. T. v. G. 1937. blz. 1536.
198. Klin. Woch. 1932. S. 1487.
199. Klin. Woch. 1931. S. 694.
200. Z. Klin. Med. Bd. 120. S. 725. (1932).
201. C. R. Soc. Biol. Bd. 86. p. 192. (1922).
202. Beitr. Klin. Tbk. Bd. 71. S. 332. 1929.
203. Erg. der Hyg. Bakter. Imm. u. exp. Th. Bd. 6. S. 103. 1923.
204. C. R. Soc. Biol. Bd. 76. p. 180. (1914).
205. Amer. Rev. of Tuberc. Bd. 9. p. 112. (1924).
206. Zentr.bl. f. d. ges. Tbk. Forschg. 1924. Bd. 22. Ref.
207. Naar Schulte-Tigges. Immunität u.s.w. Bd. I. S. 124. (1929).
208. Lancet. Bd. 208. p. 1331. 1925. (gecit.).
209. Rev. de la Tuberc. 1921. p. 389.
210. Arch. de méd. des enfants. p. 537. 1922. gecit.
211. Rev. de la Tuberc. 1925. p. 389.
212. Arch. Int. Med. Bd. 14. p. 786. (1914).
213. Ref. in Zentr.bl. f. d. ges. Tbk. f. 1925.
214. Paris méd. 1922. p. 485. gecit.
215. Med. Klin. 1923. S. 688.
216. Dtsch. med. Woch. 1922. S. 379.
217. Z. Tbk. Bd. 54. S. 132. (1929).
218. Rev. de la Tub. 1921. p. 398.

219. Rev. de la Tub. 1921. p. 384.
220. Clin. ophthalm. Bd. 10. 1921. S. 496. gecit.
221. Rev. de la Tub. 1922. p. 431.
222. Ref. in Zentr.bl. f. d. ges. Tbk. f. 1926. S. 460.
223. Zschr. f. Tuberk. Bd. 43. S. 372. (1925).
224. Rev. belge sci. méd. p. 113. 1931. gecit.
225. Ref. in Zentr.bl. f. d. ges. Tbk. f. 1928. S. 608.
226. Rev. de la Tuberc. p. 400. 1921.
227. Ref. in Zentr.bl. f. d. ges. Tbk. Forschung. 1928. S. 608.
228. Z.bl. f. Bakter. Paras. Inf. Bd. 91. S. 363. 1924. gecit.
229. Policlin. Sez. med. Bd. 41. p. 721. (1932). (gecit.).
230. Z. Tbk. Bd. 38. S. 423. (1923).
231. Dtsch. Med. Woch. 1924. I. S. 624.
232. Dtsch. Med. Woch. 1924. I. S. 832.
233. Dtsch. Med. Woch. 1924. I. S. 869.
234. Dtsch. Med. Woch. 1924. I. S. 1650.
235. Americ. Rev. Tuberc. Bd. 11. p. 139. (1925). (gecit.).
236. N. T. v. G. 1925. I. blz. 1099.
237. Acad. Proefschrift Groningen. 1926.
238. N. T. v. G. 1925. I. blz. 1412.
239. Zentr.bl. f. ges. Tuberk. Forschg. Bd. 25. S. 417. (1926).
240. Zentr.bl. f. Haut- u. Geschlechtskr. Bd. 21. S. 1—30. (1926).
241. Tokohu J. Exp. Med. Bd. 20. p. 229. (1933).
242. Dtsch. Med. Woch. 1924. S. 673.
243. Zentr.bl. Bakter. Bd. 122. S. 62. (1931). en Beitr. Klin. Tuberk. Bd. 81. S. 280. (1932).
244. Klin. Woch. 1927. S. 500.
245. Münch. Med. Woch. 1930. S. 1959.
246. Klin. Woch. 1933. S. 460.
247. Z. Tbk. Bd. 64. 1932. S. 447.
248. Z. Tbk. Bd. 57. S. 163. 1930.
249. Klin. Woch. 1932. S. 97.
250. Erg. Tuberk. Forschg. Bd. V. S. 159. (1933).
251. Klin. Woch. 1933. S. 1048.
252. Klin. Woch. 1933. S. 1280.
253. Beitr. Klin. Tbk. Bd. 86. S. 37. (1934).
254. Zbl. Bakter. I. Orig. Bd. 127. Beih. S. 79. (1932).
255. Dtsch. Med. Woch. 1932. I. S. 251.
256. Zbl. Bakter. I. Orig. Bd. 130. S. 252. (1933).
257. Klin. Woch. 1934. I. S. 838.
258. Z. Tbk. Bd. 73. S. I. (1935).
259. Z. Tbk. Bd. 73. S. 184. (1935).
260. Boll. Poliambul. Ronzoni. Bd. 10. S. 271. (1936). Ref.
261. J. Imm. Bd. 25. p. 19. 1933.
262. Tubercle. Vol. 17. p. 114. (1935).
263. J. Infect. Dis. Bd. 56. p. 111. (1935).
264. Erg. Tuberk. Forschg. Bd. V. S. 170. (1933).
265. Lichtwitz. Klinische Chemie. 1930. S. 273.
266. naar v. Slijke. Quant. clin. Chemistry 1931. Interpretations. p. 246.

267. Gecit. naar Witebsky. u. Klingenstein. *Erg. der Tbk. Forschg.* 1933. Bd. V. S. 161.
268. *C. R. Soc. Biol.* Bd. 114. p. 267. (1934).
269. Zie ook: Ickert, in *Erg. der ges. Tbk. Forschg.* Bd. III. 1931. S. 497.
270. *Beitr. Klin. Tbk.* Bd. 88. S. 646. (1936).
271. *Congrès pour l'étude de la tuberculose.* Paris. Juli—Aôut. 1898. p. 578.
272. *Dtsch. Med. Woch.* 1906. S. 945.
273. *Berl. Klin. Woch.* 1907. S. 1135.
274. *Dtsch. Med. Woch.* 1908. S. 868.
275. *C. R. Soc. Biol.* 1909. p. 485.
276. *Centr. Bl. Bakter., Paras. u. Inf. I.* Bd. 58. S. 139. (1911).
277. *C. R. Soc. Biol.* Bd. 70. p. 586. (1911).
278. *Rev. de la Tub.* 1921. T 2. p. 373.
279. *J. of Imm.* Bd. 7. p. 423. (1922).
280. *Med. Klin.* 1923. S. 688.
281. *Z. Tbk.* Bd. 38. S. 401. (1923).
282. *Z. Schr. Klin. Med.* Bd. 101. p. 1. (1924).
283. *C. R. Soc. Biol.* Bd. 93. p. 1145. (1925).
284. *Z. f. Imm. Forschg. Orig.* Bd. 42. S. I. (1925).
285. *Z. Tbk.* Bd. 43. S. 191. (1925).
286. *C. R. Soc. Biol.* Bd. 94. p. 502. (1926).
287. *C. R. Soc. Biol.* Bd. 95. p. 398. (1926).
288. *Z. Tbk.* Bd. 54. S. 132. (1929).
289. *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.* Vol. 26. p. 672. (1929).
290. *Americ. Rev. of Tub.* Vol. 22. p. 170. (1930).
291. *Z. Imm. Forschg.* Bd. 85. S. 254. (1935).
292. *Erg. ges. Tbk. Forschg.* Bd. VI. 1934. S. 679.
293. *Klin. Woch.* 1937. S. 428.
294. *Oppenheimers Handbuch der Biochemie.* Bd. 4. S. 185—208. 1925.
295. *Klinische diagnostiek* 1930. blz. 355.
296. Gecit. naar Staehelin in: *Handbuch der Inneren Medizin.* Bd. 2. II. S. 1160. (1930).
297. *Lehrbuch der Differentialdiagnose innerer Krankheiten.* 1929. S. 329.
298. *The clinical pathology of thoracic puncture fluids* 1930.
299. *Beitr. Klin. Tbk.* Bd. 74. S. 652. (1930).
300. *Acta Med. Scand.* Bd. 68. Suppl. 23. S. 458. (1928).
301. *Aanw. op diagn. en ther. gebied.* III. Blz. 444. 1932.
302. Saenz et Costil. *Diagnostic bactériologique de la tuberculose* 1936. p. 92.
303. *Beitr. Klin. Tbk.* Bd. 75. S. 701. (1930).
304. *N. T. v. G.* 1938. blz. 18.
305. *Dtsch. Arch. Klin. Med.* Bd. 109. S. 351. (1913).
306. *Beitr. Klin. Tbk.* Bd. 75. S. 748. (1930).
307. *Rev. de la Tuberc.* 1922. p. 434. (gecit.).

STELLINGEN.

I.

Prophylactische bloed- of bloedseruminjecties van reconvalescenten of gezonde volwassenen verdienen in vele gevallen aanbeveling ter voorkoming of ter verzachting der mazelen.

II.

De verschijnselen van de nephrose berusten op een glomerulus-aandoening.

III.

Ook eiwitvrije stoffen kunnen als antigeen werken.

IV.

De serologische antilichamen tegen hormonen berusten op de werking van de carbolgroep als antigeen.

V.

In normale omstandigheden functioneert het foetale ademhalings-mechanisme.

VI.

In de behandeling van de liesbreuken blijft voorloopig de operatieve behandeling verkieslijk boven de injectietherapie.

VII.

Het is waarschijnlijk, dat bij de Morbus Paget mammae het carcinoom ontstaat in de groote melkgangen dicht bij de inmondingsplaats in den tepel, vanwaar het zich kan uitbreiden, zoowel in de huid als langs de melkgangen naar de diepte.

VIII.

De behandeling der croupeuze pneumonie met antipneumococcenserum is een groote verbetering. Men bestede vooral aandacht aan het gebruik van konijnen-antipneumococcenserum.

IX.

De lichaampjes van Gandy-Gamna vinden hun ontstaan in kleine bloedingen, onafhankelijk van eenige schimmel.

X.

De behandeling van de fractura colli femoris intracapsularis met de metalen pen van Smith-Petersen of met die van Sven Johansson is verwerpelijk.

XI.

Bij een patient met een peritonsillair absces verrichte men „tonsillectomie à tiède”.

XII.

Bij de behandeling van endometriose heeft (röntgen) castratie niet altijd het gewenschte resultaat.

XIII.

De beoordeeling van de psychische ontwikkeling in de eerste drie levensjaren is zonder grondige kennis der neurologie niet mogelijk.

VAN GORCUM & COMP. N.V. - ASSEN